

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Untersuchung zur Identifikation und Charakterisierung
potentieller Virulenzfaktoren von *Cronobacter sakazakii* ES5

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Theresa Maria Laufer
aus Villingen-Schwenningen

2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dipl. ECAR Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	<i>Cronobacter sakazakii</i>	2
1.1.	Taxonomische Stellung	2
1.2.	Vorkommen und Nachweismethoden	3
1.3.	Klinik und Pathogenese	4
1.3.1.	Genomsequenzierung von <i>C. sakazakii</i>	5
1.3.2.	Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren	5
1.3.2.1.	Adhäsion und Invasion	7
1.3.2.2.	Biofilmbildung	8
1.3.2.3.	Pigmentbildung	9
1.3.3.	Tiermodel	10
1.3.4.	Immunreaktion und Kompensation durch <i>Cronobacter</i> spp.	11
III.	MATERIAL UND METHODEN	13
1.	Material	13
1.1.	Bakterienstämme	13
1.2.	Zelllinien	15
1.3.	Plasmide und Vektoren	16
1.4.	PCR-Primer	16
1.5.	Enzyme und Enzymreaktionspuffer	17
1.6.	Chemikalien und Kits	18
1.7.	Nährmedien	19
1.8.	Zusätze zu Nährmedien	20
1.8.1.	Antibiotika	20
1.8.2.	Weitere Zusätze	20
1.9.	Medien und Lösungen für Zellkultur	20
1.10.	Puffer und Lösungen	22
1.10.1.	Puffer und Lösungen für DNA-Isolierung	22
1.10.2.	Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	22
1.10.3.	Puffer und Lösungen für colorimetrisches Verfahren	23
1.11.	Geräte	25
1.12.	Software	25

1.13.	Datenbanken.....	25
2.	Methoden.....	26
2.1.	Kultivierung von Bakterien.....	26
2.1.1.	Kultivierung von <i>Cronobacter sakazakii</i>	26
2.1.2.	Konservierung von Bakterien (Glycerinkultur)	26
2.2.	Molekulargenetische Methoden	26
2.2.1.	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	26
2.2.1.1.	Präparation von genomischer DNA	26
2.2.1.2.	Präparation von genomischer DNA (<i>quick version</i>)	27
2.2.1.3.	Präparation von Plasmid-DNA	27
2.2.1.3.1.	Plasmidpräparation in kleinem Maßstab	27
2.2.1.3.2.	HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> / <i>C. sakazakii</i> ...	27
2.2.2.	Reinigung und Konzentrierung von DNA	28
2.2.2.1.	Phenolextraktion.....	28
2.2.2.2.	Alkoholfällung	28
2.2.2.3.	Entsalzen von Plasmid-DNA	29
2.2.2.4.	Konzentrationsbestimmung der DNA	29
2.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.3.1.	PCR mit ganzen Zellen als Template.....	30
2.2.4.	Techniken zur Charakterisierung von DNA Molekülen	30
2.2.4.1.	Hydrolyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
2.2.4.2.	Agarosegelelektrophorese	31
2.2.5.	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.5.1.	Dephosphorylierung des Vektors	32
2.2.5.2.	Aufreinigung	32
2.2.5.3.	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA.....	32
2.2.6.	DNA-Transfer	33
2.2.6.1.	Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl ₂ -Methode	33
2.2.6.2.	Transformation CaCl ₂ -kompetenter Zellen.....	33
2.2.6.3.	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	33
2.2.6.4.	Transformation elektrokompenter Zellen.....	34
2.3.	Wachstumsanalysen	35
2.3.1.	Wachstumsanalyse von Transposonmutanten im Vergleich zum Wildtyp <i>C. sakazakii</i> ES5	35

2.3.2.	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur.....	35
2.3.3.	Bestimmung der CFU in der Infektionslösung I.....	36
2.3.4.	pH-Wert-Untersuchung bei <i>C. sakazakii</i> -Stämmen im Wachstumsverlauf mit und ohne Glucose	37
2.4.	Motilitätsassay.....	38
2.4.1.	Motilitätsanalyse im Weichagar.....	38
2.4.2.	Motilitätsanalyse im Weichagar unter Zusatz von Tween 80.....	38
2.4.3.	Motilitätsanalyse im Weichagar unter Zusatz von sterilfiltriertem Überstand aus einer <i>C. sakazakii</i> -WT-Flüssigkultur.....	38
2.5.	Colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von metabolisierbaren Kohlenstoffquellen	39
2.6.	Zellkultur.....	40
2.6.1.	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	40
2.6.2.	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen	41
2.6.2.1.	Einfrieren.....	41
2.6.2.2.	Auftauen	41
2.6.3.	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	41
2.6.4.	Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Gelatine	42
2.6.5.	Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>C. sakazakii</i> -Stämmen	42
2.6.5.1.	Gentamycin-Assay mit Caco-2-Zellen.....	42
2.6.5.2.	Gentamycin-Assay mit RAW-264.7-Zellen.....	44
2.6.5.3.	Gentamycin-Assay mit HBMEC-Zellen	45
IV.	ERGEBNISSE	46
1.	Eigenschaften und Morphologie der <i>C. sakazakii</i> ES5- Transposoninsertionsmutanten	46
2.	Sequenzierung von Transposoninsertionsmutanten	47
3.	Komplementation und Charakterisierung der <i>crtY</i>-Mutante.....	48
3.1.	Konstruktion des Komplementationskonstruktes pUC19- <i>crtY</i>	50
3.2.	Isolierung und Analyse der komplementierten <i>crtY</i> -Mutante	52
3.3.	Phänotypische Analyse der komplementierten <i>crtY</i> -Mutante.....	54
3.4.	Überprüfung der Inkompatibilität von pUC19- <i>crtY</i> in <i>C. sakazakii</i> ES5 ..	56
3.5.	Wachstumsanalyse der komplementierten <i>crtY</i> -Mutante im Vergleich zum Wildtyp <i>C. sakazakii</i> ES5 und der <i>crtY</i> -Insertionsmutante.....	57

3.6.	Phänotypische Analyse der <i>crtY</i> -Mutante im Zellkultursystem.....	59
3.6.1.	Caco-2-Zellen: Adhäsion, Invasion, intrazelluläre Proliferation	60
3.6.2.	RAW-264.7-Zellen: Adhäsion, Invasion, intrazelluläre Proliferation	60
3.6.3.	HBMEC-Zellen: Adhäsion, Invasion, intrazelluläre Proliferation.....	61
4.	<i>In vitro</i> Wachstumsanalyse der Transposon-insertionsmutanten	62
5.	Untersuchung zur Pathogenität von <i>C. sakazakii</i> ES5- Transposonmutanten	64
5.1.	Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit der Transposon-mutanten bei Caco-2-Zellen.....	66
5.2.	Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit der Transposon-mutanten in RAW-264.7-Zellen.....	68
5.3.	Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit der Transposon-mutanten in HBMEC-Zellen	71
6.	Physiologische und biochemische Analyse der Flagellen bei <i>C.</i> <i>sakazakii</i> ES5.....	76
6.1.	Überprüfung der Motilität von <i>C. sakazakii</i> ES5 und Flagellen-Mutanten	76
6.2.	Überprüfung der pH-Wert-Änderung beim Wachstum in LB- Flüssigmedium mit Zusatz von Glucose	83
7.	Identifizierung von metabolisierbaren Kohlenstoffquellen	85
7.1.	Vergleich der Stoffwechselaktivität bei <i>Cronobacter</i> spp.-Stämmen.....	86
7.2.	Charakterisierung des Kohlenstoffmetabolismus bei <i>C. sakazakii</i> ES5- Transposoninsertionsmutanten.....	90
7.2.1.	Aminosäuren als Kohlenstoffquelle	91
7.2.2.	Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels als Kohlenstoffquelle	93
7.2.3.	Lebensmittel und Lebensmittelzusätze als Kohlenstoffquelle	95
7.2.4.	Vorwiegend umweltassoziierte Substrate als Kohlenstoffquelle	97
V.	DISKUSSION	99
1.	Identifizierung von potentiellen Virulenzfaktoren.....	99
1.1.	Die Rolle der Biofilmproduktion für die Virulenz von <i>C. sakazakii</i> ES5	100
1.2.	Serumresistenz als Pathogenitätsmerkmal	106
1.3.	Pigmentierung und ihre Funktion bei <i>C. sakazakii</i> ES5.....	107

2.	Funktionale Charakterisierung von potentiell neuen Virulenzfaktoren	112
	
2.1.	Bedeutung der Flagellen in der Virulenz von <i>C. sakazakii</i> ES5	112
2.2.	Analyse des Kohlenstoffmetabolismus	118
2.2.1.	Speziesbesonderheiten in der Kohlenstoffmetabolisierung	119
2.2.2.	Charakterisierung des Kohlenstoffmetabolismus von <i>C. sakazakii</i> ES5 an Hand der Transposoninsertionsmutanten	121
3.	Funktion der Lycopen-β-Cyclase in der Carotinoid-Biosynthese von <i>C.</i> <i>sakazakii</i> ES5.....	124
4.	Ausblick.....	128
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	129
VII.	SUMMARY.....	132
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	134
IX.	ANHANG	148
X.	DANKSAGUNG	156

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
BBB	Bluthirn-Schranke (<i>Blood-Brain-Barrier</i>)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> , koloniebildende Einheit
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
<i>Csa</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>
<i>Ctu</i>	<i>Cronobacter turicensis</i>
d.h.	das heißt
DC	<i>Dendritic Cells</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-Integrin</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GIT	Magen-Darm-Trakt (Gastrointestinal-Trakt)
h	Stunde
i.E. / U	internationale Einheiten / Unitis
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar (Mol/l)
mA	Milliampere

MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator
MAP	Mitogen Activated Protein
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity Of Infection
MS	Massenspektrometrie
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.i.	<i>post infection</i> (nach der Infektion)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
V	Volt
w/v	<i>weights per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Cronobacter sakazakii ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, nicht-sporenbildendes, fakultativ anaerobes Bakterium, das in der Natur ubiquitär vorkommt und bereits aus verschiedensten Quellen isoliert wurde. Für die Lebensmittelindustrie stellt das Bakterium vor allem bei der Produktion von pulverförmiger Säuglingsnahrung ein Problem dar, da hier kein steriles Herstellen möglich ist. Somit kann es zum Beispiel über kontaminiertes Milchpulver zur Infektion von Neugeborenen kommen. Bei Neonaten löst *C. sakazakii* nekrotisierende Enterocolitiden, Bakteriämien und schwer verlaufende Meningitiden aus, die hochgradige geistige Behinderung nach sich ziehen und häufig letal sind.

Obwohl der Infektionsweg und die Klinik gut untersucht sind und zahlreiche Nachweismethoden für *C. sakazakii* in verschiedenen Lebensmitteln existieren, ist bislang wenig über die Pathogenitätsfaktoren und ihre Funktion während der Infektion bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass neben bereits gut charakterisierten Faktoren wie dem Membranprotein OmpA (*outer membrane protein A*), welches die Invasion des Pathogens über wirtseigene zerebrale Fibronektinstruktur begünstigt, weitere Virulenzfaktoren für die Adhäsion und Invasion der Wirtszellen, sowie die intrazelluläre Proliferation wichtig sind.

Das Ziel dieser Arbeit war, anhand von 28 *C. sakazakii*-Stämmen aus einer Transposonmutantenbank (Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Universität Zürich), neue Erkenntnisse über die Pathogenitätsmechanismen des Bakteriums zu gewinnen. Die inaktivierten Gene der ausgewählten Stämme kodieren für Transport- und Bindeproteine sowie für Enzyme, die an Biofilmbildung, Flagellenausbildung oder an spezifischen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Die Mutanten wurden in drei Zellkultursystemen: Caco2-, RAW 264.7- und HBMEC-Zellen auf ihre Adhäsions-, Invasions- und intrazelluläre Proliferationsfähigkeit untersucht. Dieses Vorgehen ist an den Infektionsweg von *C. sakazakii* *in vivo* angelehnt: Orale Infektion des Organismus, primäre lokale Infektion im Darm, systemische Infektion über die Invasion in Makrophagen und schließlich das Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke und die Infektion des Gehirns. Im Anschluss daran wurden ausgewählte Mutanten in speziellen Versuchen weiterführend untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Cronobacter sakazakii*

C. sakazakii ist ein Gram-negatives, bewegliches, stäbchen-förmiges Bakterium, das ubiquitär in der Umwelt vorkommt und aus verschiedenen Quellen isoliert werden konnte. Es ist fakultativ anaerob, bildet keine Sporen und besitzt eine hohe Tenazität gegenüber Hitze, Trockenheit und osmotischem Stress.

1.1. Taxonomische Stellung

Cronobacter spp. sind Gram-negative Stäbchen und gehören zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Erstmals in der Literatur wurde *Cronobacter sakazakii* als ein gelbpigmentierter *Enterobacter cloacae* erwähnt, der dann später als eine neue Spezies, nämlich *Enterobacter sakazakii*, klassifiziert wurde (Farmer et al., 1980). Die Einordnung als eigene Spezies erfolgte aufgrund der Unterschiede in der DNA-Sequenz (*16S rDNA gene sequence analysis*), der Pigmentierung, des Verhaltens bei biochemischen Reaktionen und der Antibiotika-Sensibilität. Es konnten 15 Biogruppen differenziert werden und zwar mit der Annahme, dass es sich eventuell um unterschiedliche Spezies handeln könnte. 2007 gelang mithilfe diverser biochemischer und genetischer Methoden die Identifizierung verschiedener Spezies (Iversen et al., 2007). Infolge dessen wurde *Enterobacter sakazakii* als Genus *Cronobacter* spp. neu taxonomisch eingeordnet. Zunächst umfasste die Gattung *Cronobacter* spp. sechs Spezies, nämlich *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* und *C. genomospecies* 1. 2012 konnte eine weitere Spezies, *C. condimentii*, durch Joseph et al. (2012) identifiziert werden und *C. genomospecies* 1 wurde zu *C. universalis* umbenannt (Joseph et al., 2012). 2014 wurde mittels “*mass spectrometry method based on intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*” (MALDI-TOF) gewonnener Daten die Gattung neu strukturiert (Krasny et al., 2014).

Die bereits 2013 aufgrund von MLSA-Daten (*multilocus sequence analysis*) und biochemischer Untersuchungen dem Genus *Cronobacter* spp. neu zugeordneten drei Spezies *C. helveticus*, *C. pulveris* und *C. zurichensis* (Brady et al., 2013) wurden 2014 von Stephan et al. in *Siccibacter turicensis* com. nov., *Franconibacter helveticus* comb. nov. und *Franconibacter pulveris* com. nov.

reklassifiziert (Stephan et al., 2014). Diese neue taxonomische Einordnung wurde basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten *genome-scale analysis*, *genome-scale phylogeny* und *k-mer analysis* in Kombination mit bereits veröffentlichten Daten bezüglich der DNA-DNA-Hybridisierung und der biochemischen Charakterisierung vorgenommen.

Momentan stellt sich die Taxonomie des Genus *Cronobacter* wie folgt dar:

Taxonomische Übersicht zu *Cronobacter* spp.

Familia: *Enterobacteriaceae*

Genus: *Cronobacter*

Species: *C. sakazakii*
C. malonaticus
C. turicensis
C. muytjensii
C. dublinensis
C. universalis
C. condimentii

Des Weiteren konnte die Spezies *C. sakazakii* aufgrund der Varianz im O-Antigen in sieben Serotypen (O1-O7) unterteilt werden. Die Serotypisierung anhand der Unterschiede in der Lipopolysaccharid-Zusammensetzung ist eine Standardmethode der Diagnostik um Gram-negative Bakterien zu klassifizieren. Die Einteilung der Stämme in *C. sakazakii* O1 bis O7 erfolgt mittels eines hoch sensitiven, auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierenden Verfahrens (Sun et al., 2012).

1.2. Vorkommen und Nachweismethoden

Cronobacter spp. sind ubiquitäre Bakterien, die als opportunistische Krankheitserreger vor allem bei Neugeborenen unter vier Wochen und Frühchen eine Rolle spielen (Bar-Oz et al., 2001; Gurtler et al., 2005). *Cronobacter* spp. wurde aus vielen verschiedenen Quellen isoliert, z.B. Trockenfleisch, Reis, Wasser und aus Umweltproben, als Hauptinfektionsquelle für die vor allem bei Frühchen schwerwiegend verlaufenden Erkrankungen konnte allerdings kontaminiertes Milchpulver (PIF powdered infant formula) identifiziert werden (Yan et al., 2012). *Cronobacter* spp. sind stabile Biofilmbildner mit hoher Tenazität. Sie überleben ein weites Temperaturspektrum und sind relativ hitzeresistent. Außerdem sind sie wenig anfällig für osmotischen Stress und Trockenheit (Kim and Loessner, 2008).

Für *Cronobacter* spp. stehen mehrere Nachweismethoden zur Verfügung: entweder über Selektiv-Anreicherung in mLST/Vancomycin-Boullion und anschließendem Ausstreichen auf dem selektiven ESIA (*Enterobacter sakazakii* Identifikation Agar) Nährboden, auf dem *Cronobacter* türkis-grüne Kolonien bildet, über biochemische Reaktionen z.B. in API Test-Kits oder verschiedene PCR-Verfahren. Ein zuverlässiger Nachweis über monoklonale Antikörper mittels ELISA wird momentan getestet (Yan et al., 2012).

1.3. Klinik und Pathogenese

Klinisch äußert sich eine Infektion mit pathogenen *Cronobacter* spp. in hochgradigen nekrotisierenden Enterocolitiden (NEC), Bakteriämie und Meningitiden. Erkrankte Neonaten überleben in 40-80% der Fälle die Erkrankung nicht und wenn bleibt meist eine geistige Behinderung zurück (Bowen and Braden, 2006; Friedemann, 2009). Neben dem schweren Krankheitsverlauf bei Neugeborenen sind auch klinische Fälle bei älteren Säuglingen und immunsuppremierten Erwachsenen beschrieben, die aber in der Regel weniger ernst verlaufen (Bowen and Braden, 2006; Gosney et al., 2006; Holy and Forsythe, 2013; See et al., 2007).

Nach der oralen Aufnahme der Bakterien kommt es zu einer primären lokalen Infektion im Darm. Vermutlich über das Lösen der *tight junction* und durch andere, bislang noch wenig charakterisierte Mechanismen, kann *C. sakazakii* die Blut-Darm-Schranke überwinden und zu einer systemischen Infektion führen. Den sepsisfähigen Bakterien ist nicht nur das Überleben im Blut – intrazellulär in Makrophagen – möglich, sondern auch das Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke und damit die Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS). Invasion, Persistenz und Proliferation virulenter *Cronobacter* spp.-Stämme in Wirtszellen scheint bei der Pathogenese und der Klinik eine entscheidende Rolle zu spielen. Bislang gelang es jedoch nicht, die damit in Zusammenhang stehenden Virulenzfaktoren und die Mechanismen auf zellulärer Ebene vollständig zu identifizieren.

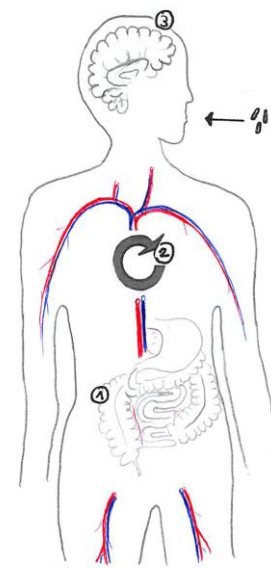


Abb. 1: Orale Infektion, primäre lokale Infektion im Darm, systemische Infektion über die Invasion in Makrophagen, Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke und Infektion des Gehirns.

Die massiven Schäden im Gehirn werden hauptsächlich durch die Entzündungsreaktion des Körpers auf die bakterielle Invasion verursacht (Townsend et al., 2007b).

1.3.1. Genomsequenzierung von *C. sakazakii*

Die Genome diverser *C. sakazakii*-Stämme wurden bereits analysiert. Vollständig gelang dies erstmals Kucerova und Kollegen 2010 für *C. sakazakii* ATCC BAA-894, inzwischen liegt auch die komplette Genom-Sequenz von *C. sakazakii* CMCC 45402, *C. sakazakii* SP291 und *C. sakazakii* ES15 vor (Kucerova et al., 2010; Shin et al., 2012; Yan et al., 2013; Zhao et al., 2014). Die Stämme besitzen ein zirkuläres Chromosom mit ca. 4,3 mb und einem GC-Anteil von 57%. Bei *C. sakazakii* ATCC BAA894 und *C. sakazakii* CMCC 45402 sind außerdem zwei und bei *C. sakazakii* Sp291 drei zirkuläre Plasmide vorhanden. Insgesamt konnten zwischen 4.100 und 4.400 Gene identifiziert werden, die für ca. 3.900 bis 4.500 Proteine codieren.

1.3.2. Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren

Es ist bekannt, dass *Cronobacter* die Blut-Darm- sowie die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und auf Grund des Überlebens im Blut (intrazellulär in Makrophagen) sepsisfähig ist, die Mechanismen hierfür konnten allerdings noch nicht vollständig identifiziert werden.

Cronobacter spp. zeichnen sich durch eine besonders hohe Säuretoleranz aus und sind diesbezüglich die am besten an das Überleben im Gastrointestinaltrakt (GIT) angepassten *Enterobacteriaceae* (Jaradat et al., 2014; Jöhler et al., 2010).

Wie bei allen Gram-negativen Bakterien spielt bei *Cronobacter* spp. LPS (Lipopolysaccharid) als Immunogen eine Rolle. Das Endotoxin wird beim Absterben der Bakterien oder unter Stressbedingungen freigesetzt und kann unter Umständen zu dem sogenannten Endotoxin-Schock führen. LPS ist aus drei Komponenten zusammengesetzt: Lipid A, Kernpolysaccharide und O-Antigen. Lipid A ist in der äußeren Membran verankert und verursacht beim Zerfall des Bakteriums die Endotoxinwirkung und Cytokinbildung. Die Kernpolysaccharide aus Heptose und Ethanolamin bilden den konstanten Teil. Die äußere Komponente ist die O-spezifische Polysaccharidkette (O-Antigen), die aus mehreren Hexosen zusammengesetzt ist und selbst innerhalb einer Spezies große Unterschiede aufweisen kann. Bei *Cronobacter* spp. ist die immunogene Wirkung

des LPS vergleichsweise schwach, was durch die Zusammensetzung und Struktur der O-spezifischen Polysaccharidkette bedingt ist (Jaradat et al., 2011; MacLean et al., 2009). Neben der Wirkung als Immunogen erhöht LPS die Durchlässigkeit von Membranen und begünstigt somit die systemische Infektion durch Darmbakterien wie *C. sakazakii* (Townsend et al., 2007b).

Die Synthese von Exotoxinen wurde zwar in einzelnen Studien für *Cronobacter* beschrieben (Holy and Forsythe, 2013; Pagotto and Farber, 2009; Pagotto et al., 2003), konnte aber in anderen Studien nicht verifiziert werden. Wenn überhaupt scheinen Exotoxine bei *Cronobacter* spp. eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Als potentielle Virulenzfaktoren werden Gene folgender Gruppen diskutiert: Adhäsion, Invasion und Biofilmbildung (z.B. *outer membran protein A*, OmpA), die Eisennutzung, der Schutz gegen Sauerstoffradikale (*Superoxide dismutase*, SOD) und Sekretions- und Transportmechanismen, wie Sec- und Typ VI-Sekretionssystem (T6SS) (Carranza et al., 2009). Mithilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) wurden fünf putative T6SS-Gencluster im *Cronobacter*-Genom identifiziert (Jaradat et al., 2011). Bei anderen Bakterien-Spezies steht das Typ VI-Sekretionssystem im Zusammenhang mit Adhäsion, Cytotoxizität, Invasion in Wirtszellen und intrazellulärem Überleben in Makrophagen. Bei *Cronobacter* spp. ist noch unklar, ob die Gene für ein funktionelles Typ VI-Sekretionssystem kodieren.

Bei Neonaten ist vermutlich die Zerstörung der *tight junctions* ursächlich für die systemische Infektion durch *Cronobacter* spp. (Kim et al., 2010). Außerdem könnte bei Neugeborenen die reduzierte Magensäure-Produktion sowie die noch nicht vollständig effektive angeborene Immunantwort die Infektion begünstigen (Townsend et al., 2007b).

Beim Zusammenbruch der gastrointestinalen Barriere hat der Entzündungsmediator Stickstoffmonoxid (NO) eine Schlüsselrolle inne. NO ist ein sekundärer Botenstoff, der bei der Infektion mit *Cronobakter* spp. vermehrt synthetisiert wird. Die Interaktion von OmpA mit den dendritischen Zellen und den Darmepithelzellen steigert die Expression der NO-Synthase und damit die NO-Produktion. Im Gegensatz zu *ompA*-positiven *Cronobacter* lösen *ompA*-negative Mutanten trotz LPS keine Steigerung des NO-Levels aus. Die Hemmung der NO-Synthase führt zu einer stark verminderten Apoptose der IEC6-Zellen (Darmepithelzellen von Ratten), was auf die Relevanz des Mechanismus bezüglich der Pathogenität schließen lässt. Neben dem cytopathischen Effekt von

NO scheint die Invasion von *Cronobacter* spp. in dendritische Zellen die Hauptursache für das Zusammenbrechen der Blutdarm-Schranke zu sein. Die infizierten Zellen reagieren mit einer gesteigerten TNF- β -Produktion, was zur Lösung der *tight-junctions* und ebenfalls zur Apoptose der Enterozyten führt (Emami et al., 2011).

Das *outer membran protein A* (OmpA) wird vom *ompA* Gen kodiert, das bereits in pathogenen Mikroorganismen wie *E. coli* und *S. Typhimurium* nachgewiesen werden konnte und auch im Genom von allen bislang getesteten *Cronobacter* spp. Stämmen identifiziert wurde (Yan et al., 2012). Es spielt eine Rolle in diversen für die Infektion bedeutenden Vorgängen, wie die Adhäsion an und die Invasion in die Wirtszellen, die Biofilmbildung, das Umgehen der Immunantwort, das Überleben im Blut sowie als Immunogen (Carranza et al., 2009; Smith et al., 2007). Durch die Produktion von OmpA wird die Bindung an die zerebralen Fibronectin-Strukturen des Wirtes ermöglicht (Friedemann, 2008). Bei *C. sakazakii* konnte mit Hilfe einer *ompA*-Mutante gezeigt werden, dass OmpA essentiell für die Invasion in Darmepithelzellen und menschliche mikrovaskuläre Hirndothelzellen ist, da die Invasionsrate der Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert war (Carranza et al., 2009; Singamsetty et al., 2008). Allerdings scheint bei *C. sakazakii* OmpA keine Auswirkung auf die Serumresistenz zu haben (Townsend et al., 2007b).

Eine Studie mit *ompA*- bzw. *ompX*- Mutanten sowie einer Deletionsmutante in beiden Genen ($\Delta ompA \Delta ompX$) konnte zeigen, dass auch OmpX als Virulenzfaktor bedeutend ist. OmpA wurde zwar als alleiniger Faktor für die Adhäsion und die basolaterale Invasion bei Caco2-Zellen identifiziert, allerdings scheint OmpX als Schutz vor dem Komplementsystem sowie dem Überleben in Makrophagen essentiell zu sein. Die Mutante, die für *OmpA* und *OmpX* defekt ist, wies die niedrigste Invasionsrate bei eukaryotischen Zellen auf. Daher ist die Vermutung naheliegend, dass OmpA und OmpX an unterschiedliche Wirtszell-Rezeptoren binden und so synergistisch wirken. Die Rezeptoren scheinen nicht nur apikal, sondern auch basolateral exprimiert zu sein (Kim et al., 2010).

1.3.2.1. Adhäsion und Invasion

Die Adhäsion an eukaryotische Zellen über Flagellen, Fimbrien und Rezeptoren ermöglicht pathogenen Mikroorganismen das Eindringen in Wirtszellen. Die Invasionsfähigkeit ist ein bedeutender Virulenzmechanismus, da sich die

Bakterien so vor dem Immunsystem geschützt vermehren und im Körper ausbreiten können.

Auch *C. sakazakii* ist in der Lage, an Darmzellen wie z.B. Caco-2-Zellen zu adhären und in sie einzudringen. Intrazellulär persistieren *Cronobacter* spp. ohne dass es zu einer ausgeprägten Proliferation kommt. Werden vor der Infektion die *tight junctions* zerstört oder die mikrotubalen Strukturen geschädigt, ist die Invasion in die Caco-2-Zellen signifikant erhöht (Kim and Loessner, 2008). *Cronobacter* ist nicht nur in der Lage, Darmzellen zu befallen und intrazellulär in ihnen zu überleben, sondern das Bakterium persistiert auch in Makrophagen, die als Teil des angeborenen Immunsystems des Körpers speziell die Funktion besitzen Fremdprotein zu zerstören. Nach der Aufnahme durch Makrophagen kommt es nicht zur Phagozytose und Lyse der Bakterien, sondern zur intrazellulären Persistenz und in geringem Maße zur Proliferation (Townsend et al., 2007b). Neben der Invasion und Proliferation in Darmzellen und Makrophagen konnte auch die erfolgreiche Besiedelung von humanen mikrovaskulären Hirnendothelzellen nachgewiesen werden (Carranza et al., 2009). Dies erklärt zum einen, warum *Cronobacter* spp. die Bluthirnschranke überwinden kann und zum anderen das massive Ausbreiten im ZNS.

1.3.2.2. Biofilmbildung

Cronobacter spp. gehören zu den sogenannten Biofilm-Bildnern, also zu jenen Bakterien, die in der Lage sind über Biofilmsynthese ihre Tenazität zu erhöhen. Biofilm ist ein Konstrukt aus Bakterienzellen, die eingebettet in extrazelluläre Matrix an Oberflächen haften. Innerhalb des Biofilms können die Bakterien geschützt vor Umwelteinflüssen wie Austrocknung, der Immunantwort oder Antibiotika proliferieren. Die Ausbildung des Biofilms beginnt mit der irreversiblen Anhaftung der Bakterien an eine Oberfläche, gefolgt von bakterieller Teilung und der Produktion von extrazellulärer Matrix und schließlich dem Ausbau der Matrix und die Ausbreitung der Bakterien (Solano et al., 2014).

Der Biofilm variiert von Stamm zu Stamm und vor allem je nach Oberfläche stark (Hartmann et al., 2010). Er ist aus linearen Makromolekülen wie Pili, LPS bei Gram-negativen bzw. Teichonsäuren bei Gram-positiven Bakterien, Exopolysacchariden und Glycocalix-Matrix zusammengesetzt und liegt in der viskösen Phase hydratisiert vor (Costerton et al., 1987).

Bei *Cronobacter* spp. kommt noch hinzu, dass einige Stämme in der Lage sind, Kapseln auszubilden. Die Kapselpolysaccharide spielen genauso wie die Produktion von Exopolysacchariden (EPS) eine wichtige Rolle in der Biofilmbildung. Die Synthese von colanic acid-EPS wird durch ESA_0115-01175 codiert, die *wzABCKM*-Gene konnten in allen *Cronobacter* spp. nachgewiesen werden (Jaradat et al., 2014; Joseph et al., 2012). Außerdem wurde Zellulose als Teil der extrazellulären Matrix identifiziert (Grimm et al., 2008; Lehner et al., 2005). Gene, die für die Zellulosesynthese, aber auch für die Synthese und Struktur von Flagellen codieren, scheinen in der Biofilmbildung von *Cronobacter* spp. von Bedeutung zu sein. Außerdem führt eine Insertionsmutagenese in diesen Genen zu einer Änderung in der Quantität und Qualität der Biofilmbildung. Anhand dieser Biofilm-Mutanten konnte gezeigt werden, dass auch bei der Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen die Fähigkeit zur Biofilmbildung eine Rolle spielt. Die Zellulose-Synthese hat zwar keinen Einfluss auf die Adhäsion an Caco-2-Zellen, dafür aber intakte Flagellen und noch nicht näher identifizierte hypothetische Proteine, die damit als potentielle Virulenzfaktoren diskutiert werden müssen (Lehner et al., 2005).

1.3.2.3. Pigmentbildung

In Bakterien sind primär Carotinoide als Pigmente von Bedeutung. Carotinoide sind gelbe, orange und rote Farbstoffe, die in Bakterien, aber auch in Pflanzen und Pilzen, weit verbreitet sind. Im Gegensatz zum Säugetier können diese Organismen Carotinoide selbst synthetisieren. Sie bestehen aus einem C₄₀- bzw. bei Bakterien aus einem C₄₀- oder C₃₀-Kohlenstoffgerüst mit azyklischen oder zyklischen Gruppen an einem oder an beiden Enden. Typisch sind die Doppelbindungen und dadurch die Möglichkeit, sowohl in cis- als auch in trans-Form vorzuliegen. Die Synthese erfolgt aus zwei farblosen C₂₀ Geranylgeranyl-Diphosphat Molekülen (Mondol et al., 2013).

Carotinoide werden als potentielle Virulenzfaktoren diskutiert, da eine Schutzfunktion gegenüber UV-Licht, oxidativem Stress und pH-Wert-Veränderungen sowie der Einfluss auf die Membranstabilität nachgewiesen werden konnte (Mondol et al., 2013). Es ist daher möglich, dass sie auch bei Adhäsion und Invasion in die eukaryotischen Zellen und darüber hinaus beim Überleben und der Vermehrung in der Zelle eine Rolle spielen. Im Genom von *C. sakazakii* konnte ein Gencluster identifiziert werden (ESA00341-ESA00347), das

für die gelbe Pigmentation der Kolonien verantwortlich ist (Lehner et al., 2006). Die exakte Struktur der synthetisierten Pigmente sowie der Ablauf der Biosynthese konnten erst vor kurzem näher charakterisiert werden (Zhang et al., 2014).

Ein potentieller Einfluss der Pigmente auf die Virulenz von *C. sakazakii* konnte allerdings noch nicht nachgewiesen werden. Bei *S. aureus* konnte im Gegensatz zu *C. sakazakii* der Zusammenhang zwischen Pigmentbildung und der Überlebensfähigkeit in neutrophilen Granulozyten – vermutlich über den Schutz vor „oxidative burst“ – gezeigt werden (Johler et al., 2010). Bei *Cronobacter* spp. sind weitere Untersuchungen zur Auswirkung der Pigmente auf die Virulenz nötig.

1.3.3. Tiermodel

Bislang gibt es für *C. sakazakii* kein geeignetes Tiermodel. Sowohl die Versuche mit jungen Schweinen, Kaninchen und Meerschweinchen wie auch mit neonatalen Ratten, die bei anderen *Enterobacteriaceae*, z.B. bei *E. coli* und *Citrobacter* zur Erforschung der Bluthirnschranke genutzt werden, liefern keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Carranza et al., 2009; Townsend et al., 2007b). Neben der intraperitonealen Infektion von neonatalen Ratten wurde an neonatalen Gerbils die orale Infektion getestet. Auch hier war eine extrem hohe Bakteriendosis (10^9 CFU) nötig, um eine Infektion hervorzurufen. Trotz dieses negativen Aspekts werden aus Mangel an besser geeigneten Tiermodellen neonatale Ratten und Wüstenrennmäusen bei *in vivo* Versuchen mit *Cronobacter* verwendet (Carranza et al., 2009).

Es wurden nicht nur Säugetiere auf die Eignung für *in vivo* Versuche getestet, sondern auch weitere potentielle Modellorganismen: Zum einen der häufig eingesetzte Nematode *Caenorhabditis elegans*, bei dem eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate durch die Infektion mit *C. sakazakii* beobachtet werden konnte. Ursächlich dafür ist die Kumulation der Bakterien im Darm des Wurms und eine dortige massive lokale Zellzerstörung (Sivamaruthi et al., 2011). Zum anderen wird an der Universität Zürich ein Modell mit Zebrafisch-Embryonen getestet, diese vielversprechenden Ergebnisse sind aber bislang unveröffentlicht.

Prinzipiell ist zu vermuten, dass für die Erforschung der Pathogenität von *C. sakazakii* im menschlichen Organismus ein immunsupprimiertes Säugetiermodell

von Nutzen wäre, das aber bislang noch nicht zur Verfügung steht (Pagotto et al., 2003; Townsend et al., 2007b).

1.3.4. Immunreaktion und Kompensation durch *Cronobacter* spp.

Bakterien, die in der Lage sind, in Wirtszellen einzudringen, in diesen zu überleben und sich zu vermehren, sind zunächst vor Abwehrmechanismen des Immunsystems geschützt. Im Blut sind die Bakterien dem Komplementsystem ausgesetzt, das Zellyse induziert. Außerdem sind in Blut und vor allem im Gewebe polymorphe Leukozyten vorhanden, die reaktive Sauerstoff-Spezies sezernieren, die Zellmembranen zerstören und Proteine und Makromoleküle wie DNA angreifen. Die klassischen Vertreter der angeborenen Immunantwort sind Makrophagen, die über Phagozytose Fremdmaterial aufnehmen und zerstören. Virulente *Cronobacter* sind in der Lage, in Makrophagen zu persistieren und sogar in geringem Maße zu proliferieren. Vermutlich wird das Überleben durch die Superoxid-Dismutase-Aktivität, die durch die Gene *sodA* und *sodB* kodiert ist, ermöglicht. Sie schützt vor Sauerstoffradikalen und dem „oxidative burst“ beim frühen Kontakt mit Makrophagen. Bei infizierten Makrophagen ist die Sezernierung der immunsuppressiven Cytokine IL6 und IL10 erhöht (Townsend et al., 2007b). Neben den Makrophagen spielen die dendritischen Zellen (DC) eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr des Wirtes. Das sind phagozytierende Zellen, die für die Initiation der primären spezifischen Immunreaktion essentiell sind. Unreife DC diffundieren durch das periphere Gewebe, bis es zum Erstkontakt mit wirtsfremdem Protein kommt. Es folgen die Phagozytose des potentiellen Pathogens, die Reifung und Einwanderung der DC in sekundäre lymphatische Organe. Die reife DC präsentiert das Antigen des zerstörten Mikroorganismus den naiven T-Zellen, was zur Auslösung der primären spezifischen zellulären Immunantwort führt. *Cronobacter* spp. binden an DC-SIGN und verhindern über die Blockade des MAP-Kinase-Kaskadewegs die Reifung der DC und somit die Immunreaktion der Wirtszellen. Die Antigenpräsentation und die Ausschüttung der proinflammatorischen Cytokine wie IL-1 und TGF- α durch die reifen DC wird verhindert, stattdessen persistiert und proliferiert *C. sakazakii* in den dendritischen Zellen. Die Blockade der MAP-Kinase steht im Zusammenhang mit der vermehrten Ausschüttung der immunsuppressiven Cytokine IL-10 und TNF- β . Werden diese Cytokine mithilfe von Antikörpern gebunden, kann die DC reifen. *In vitro* wurde gezeigt, dass eine

Infektion mit der *Cronobacter ompA*-Deletionsmutante die Reifung der DC nicht beeinträchtigt und dass diese Mutante nicht in der Lage ist, in den DCs zu persistieren, sondern abgetötet wird (Mittal et al., 2009).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Bakterienstämme

Cronobacter sakazakii:

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *C. sakazakii*-Stämme.

Stamm	Genprodukt / Genotyp / Herkunft	Referenz
BAA-894	humanes Isolat (neonate meningitis); USA	Kucerova <i>et al.</i> , 2010
NCTC 8155	Lebensmittelisolat (tin of dried milk)	Iversen <i>et al.</i> , 2007
ATCC 29544	humanes Isolat (child's throat); Tennessee	Iversen <i>et al.</i> , 2007
CDC 0996-77	Humanes Isolat (neonate, spinal fluid); USA	Mullane <i>et al.</i> , 2008
ES5	humanes Isolat; Wildtyp	Hartmann <i>et al.</i> , 2010, Johler <i>et al.</i> , 2010
BF1	DNA-Translokase FtsK; ΔESA_02449, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF2	Flagellenprotein FlhE; ΔESA_01356, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF4	O-Antigen-Ligase; ΔESA_04103, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF5	Haken-assoziiertes Flagellenprotein; ΔESA_01287, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF8	Cytochrom-O-Ubiquinol-Oxidase-Protein CyoD; ΔESA_02873, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF9	Acetolaktat-Synthase; ΔESA_00861, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF12	Zellulose-Synthase; ΔESA_04204, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF13	Peptidoglycanhydrolase; ΔESA_02266, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF14	Hypothetisches Protein; ΔESA_00281, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF15	Hypothetisches Protein; ΔESA_00282, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
BF16	Cellulose-Synthase Subunit BcsC; ΔESA_04207, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010

BF17	Mg ²⁺ -transportierende ATPase P-1 Typ; ΔESA_pESA3p05536, Kan ^R	Hartmann <i>et al.</i> , 2010
1_4	Hypothetisches Protein; ΔESA_00345, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
2_1	Acetyltransferase; ΔESA_00344, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
24_2	Hypothetisches Protein; ΔESA_00347, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
3_1	Phytoen-Synthase CrtB; ΔESA_00342, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
31_1	Pyruvat/2-Oxoglutarat-Dehydrogenase- Komplex, E2-Untereinheit; ΔESA_02621, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
38_1	Hypothetisches Protein; ΔESA_00343, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
39_1	Acetyltransferase; ΔESA_00344, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
67_1	Hypothetisches Protein IgaA; ΔESA_04343, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
68_1	Pyruvat/2-Oxoglutarat-Dehydrogenase- Komplex, E3-Untereinheit; ΔESA_03220, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
69_1	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase- Komplex; ΔESA_02622, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
76_1	Phytoen-Dehydrogenase; ΔESA_00343, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
79_1	Malat/Laktat-Dehydrogenase; ΔESA_03622, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
82_2	Glucosyltransferasen; ΔESA_00345, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
89_1	Hypothetisches Protein; ΔESA_03563, Kan ^R	Johler <i>et al.</i> , 2010
51_C4	Hypothetisches Protein: FruR, Fructose Repressor; ΔESA_03258, Kan ^R	Schwizer <i>et al.</i> , 2013
51_C6	Hypothetisches Protein: FadR, GNTR family of transcriptional regulator; ΔCSE899_07155, ΔESA04029, Kan ^R	Schwizer <i>et al.</i> , 2013
ES5ΔompA	Outer Membran Protein A (OmpA); ΔESA_02391, Cm ^R	Schauer (unpubliziert)
ES5, pUC19	pUC19, Amp ^R	diese Arbeit
2_1, pUC19	ΔESA_00344, pUC19, Kan ^R Amp ^R	diese Arbeit
2_1, pUC19- crtY	ΔESA_00344, pUC19- crtY, Kan ^R Amp ^R ; Komplementation des crtY-Gens	diese Arbeit

Cronobacter turicensis:Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *C. turicensis*-Stämme.

Stamm	Genprodukt / Genotyp / Herkunft	Referenz
3032	humanes Isolat, Neonaten (Blut)	Stephan <i>et al.</i> , 2011
E609	Lebensmittelisolat, UK	Iversen <i>et al.</i> , 2007

Escherichia coli:Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genprodukt / Genotyp / Herkunft	Referenz
DH5α	F ⁻ , ϕ 80Δ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁻), <i>phoA</i> <i>supE44</i> , λ- <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
K12	humanes Isolat (Stuhlprobe), USA	Blattner <i>et al.</i> , 1997
INV110	F'(<i>tra</i> Δ <i>36 proAB lacI</i> ^q Δ <i>lac M15</i>) <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrC-mrr</i>)102::Tn10 (Tet ^R)	Invitrogen, Karlsruhe

Salmonella enterica serovar Typhimurium:Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendeter *S. Typhimurium*-Stamm.

Stamm	Genprodukt / Genotyp / Herkunft	Referenz
ST4/74	Säugetierisolat (Kalb mit Salmonellose), UK	Richardson <i>et al.</i> , 2011

1.2. Zelllinien

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft / Referenz
Caco-2	humane, epitheliale Colonkarzinom-Zellen	DSMZ-Nr: ACC 169
RAW 264.7	murine Monozyten-Makrophagen-Zellen	ATCC®: TIB-71
HBMEC	humane, mikrovasculäre Hirnendothelzellen	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg

1.3. Plasmide und Vektoren

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Vektor	Relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pUC19	Ap ^R , lacZ' α -Komplementationssystem	Yanish-Peron, 1985
pTAQ	Derivat von pUC19	Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
pCYC-184	Transposon mutagenesis in gram negative bacteria	Simon et al., 1983
pDG148-Stu	rapid orientated cloning	Joseph et al., 2001
pUC19- <i>crtY</i>	Komplementationsplasmid, pUC19::1.176 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment des <i>crtY</i> -Gens, Amp ^R	diese Arbeit

1.4. PCR-Primer

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer.

Primer	Sequenz 5'→3'	Herkunft/Referenz
KAN-2 RP	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	Epicentre
KAN-2 FP	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Epicentre
M13_for (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	New England Biolabs
M13_rev	GGAAACAGCTATGACCATG	New England Biolabs
Csakf	ACGCCAAGCCTATCTCCGCG	B.Stoop <i>et al</i> , 2009; Lehner <i>et al</i> , 2012
Csagr	ACGGTTGGCGTCATCGTG	B.Stoop <i>et al</i> , 2009; Lehner <i>et al</i> , 2012
EsAgf	TGAAAGCAATCGACAAGAAG	Lehner <i>et al</i> , 2006
EsAgr	ACTCATTACCCCTCCTGATG	Lehner <i>et al</i> , 2006
<i>crtYf</i> (<i>Bam</i> HI)	<u>GGATCC</u> ATGAACACGCAATGGGATC	diese Arbeit
<i>crtYr</i> (<i>Eco</i> RI)	CGGACCCGATAACAAC <u>GAATTC</u>	diese Arbeit

1.5. Enzyme und Enzymreaktionspuffer

Enzyme

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase	Biolabs
ThermoPrime <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Lysozym	Merck
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	Biolabs
RNase	Roth
T4-DNA-Polymerase	Roche
T4-DNA-Ligase	Biolabs
Reaction Buffer IV 10x	Thermo Scientific
Magnesiumchlorid	Thermo Scientific

Restriktionsendonukleasen

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen (Biolabs).

Enzym	Erkennungssequenz 5'→3'	Reaktionspuffer	Temperatur
<i>Bam</i> HI-HF	G/GATCC	NEBuffer 4	37°C
<i>Eco</i> RI-HF	G/AATTC	NEBuffer 4	37°C
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	Cut Smart	37°C
<i>Pvu</i> II	CGAT/CG	Cut Smart	37°C
<i>Sph</i> I-HF	GCATG/C	NEBuffer 4	37°C
<i>Stu</i> I	AGG/CCT	Cut Smart	37°C

1.6. Chemikalien und Kits

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Bezugsquelle	Chemikalien
BD	ECSG (Endothelial cell growth supplement), Nu-Serum IV
Biochrom	Fetales Kälberserum FCS, Heparin, L-Glutamin, MEM-Vitamine, Natriumpyruvat, PBS, PBS mit Ca^{2+} / Mg^{2+} , RPMI 1640, Trypanblau, Trypsin/EDTA und Plastik für die Zellkultur
Fluka	Isopropanol, Natronlauge, Salzsäure, Tryptone enzymatic digest from casein
Oxoid	Bacteriological Agar Yeast Extract,
peqlab	Agarose peq GOLD, Ladepuffer (6x); peqGOLD Plasmid Miniprepkti I (Order No 12-6943-01)
Qiagen	QUIquick® PCR Purification Kit
Riedel-de Haen	Ethanol absolut, Natriumphosphat
Roth	Kaliumchlorid, Kanamycinsulfat, Gentamycinsulfat, Roti-Chloroform II, Roti-PinkDNA, Saponin
Sigma-Aldrich	Calciumchlorid, Glucose, Kaliumdihydrogenphosphat, Kolliphor, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Phytigel Plant, Tetrazoelium Violet, Triton X-100, Tween 80; Sigma Gen Elute™ Plasmid Miniprep-Kit

1.7. Nährmedien

Für die Herstellung der Medien wurden die genannten Substanzen in der angegebenen Menge in A. dest. gelöst, ggf. der pH-Wert eingestellt und für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden weitere Zusätze wie Antibiotika steril zugesetzt.

LB (Luria-Bertani)	10 g	Trypton aus Casein
	5 g	Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
		auf 1 l auffüllen, pH 7,5
		Festmedium: 15 g Agar zugeben
		Weichagar: 3 g /6 g Agar zugeben
SOC	20 g	Trypton aus Casein
	5 g	Yeast-Extrakt
	3,9 g	Glucose
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	2,5 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	2,1 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
		mit A. dest. auf 1 l auffüllen, steril
		filtrieren, pH 7,0
Minimalmedium M9 (Stock 10x)	70 g	Na ₂ HPO ₄
	30 g	KH ₂ PO ₄
	5 g	NaCl
	10 g	NH ₄ Cl
		auf 1 l auffüllen
		steril filtrieren

1.8. Zusätze zu Nährmedien

1.8.1. Antibiotika

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	150 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol 70%	20 µg/ml
Gentamycin (Gen)	H ₂ O	10-100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	50 µg/ml

1.8.2. Weitere Zusätze

Tween 80

X-Gal 2 ml/l von 2%iger X-Gal-Lösung (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Galactosid)

IPTG 150 µl/l von 0,2 M IPTG

1.9. Medien und Lösungen für Zellkultur

RPMI-Komplettmedium	500 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	50 ml	FCS

HBMEC

-Komplettmedium	400 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	50 ml	FCS
	50 ml	Nu-Serum IV
	10 ml	L-Glutamin (200 mM)
	5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)
	5 ml	MEM Vitamin-Mix
	0,5 ml	Heparin (500 U/ml)
	3 ml	ECGS (5 mg/ml)

-Gentamycin-Medium	500 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	25 ml	FCS
	5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)
	10 bzw. 100 µg/ml	Gentamycin

PBS	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	1,26 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
		auf 1 l auffüllen, pH 7,0
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	0,1 g	CaCl ₂
	0,1 g	MgCl ₂
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05%	Trypsin
	0,02%	EDTA
Trypanblaulösung	0,1%	Trypanblau in PBS
Lösung A	5 ml	FCS
	20 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
Lösung B	5 ml	FCS
	15 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	5 ml	DMSO

1.10. Puffer und Lösungen

1.10.1. Puffer und Lösungen für DNA-Isolierung

Lyse-Puffer	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
		A. dest.
Lysozym	10 mg/ml Stock	Endkonzentration: 2 µg/µl
SDS	10%	
Proteinase K	10 mg/ml Stock	Endkonzentration: 0,1 mg/ml
Isopropanol	100%	
Ethanol	70% /96%	
TE-Puffer (10x)	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
		pH 7,4
RNase	10 mg/ml Stock	Endkonzentration: 0,02 mg/ml
P1	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
P2	200 mM	NaOH
	1%	SDS
P3	3 M	K-Acetat, pH 5,5

1.10.2. Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Agarose	0,8-2,0% (w/v)	Agarose in TAE (1x) aufkochen
TAE (50x)	2 M	Tris-Base
	50 mM	EDTA
		mit Essigsäure pH 8,0 einstellen, mit A. dest. auf 1 l auffüllen
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml	in A. dest.
Ladepuffer		Blue Loading Buffer 6x (Peqlab)
Marker		1 kb O'Gene Ruler DNA Ladder Mix (ThermoScientific)

1.10.3. Puffer und Lösungen für colorimetrisches Verfahren

<i>inoculating-fluid</i> (IF-MM)	4 g	NaCl
	0,3 g	Kolliphor
	0,2 g	Phytigel Plant
	0,1 g	Tetrazolium violet (Dye)
		autoklavieren, auf ca. 60°C abkühlen lassen
	100 ml	M9 (Stock 10x)
	10 ml	0,2 M MgSO ₄ (Endkonzentration 2 mM)
	0,1 ml	1 mM CaCl ₂ (Endkonzentration 0,1 µM)
		nach dem Autoklavieren steril zugeben und auf 1 l auffüllen

Kohlenhydratquellen

Die in dieser Arbeit getesteten Kohlenhydratquellen wurden in der Konzentration 0,01 M in A. dest. gelöst und sterilfiltriert. Die Abweichungen sind in dahinter stehenden Klammern vermerkt.

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Kohlenhydratquellen

2-Desoxy Adenosin ⁶	Dulcitol ⁶	L-Asparagin ²	Maltotriose ¹
Acetic Acid ³ = Essigsäure 96%	D-Malic Acid ⁶ = D-Äpfelsäure	L-Aspartic Acid ³ = L-Asparginsäure	Methylpyruvat ⁶
Adenosin ⁶	D-Mannitol ³ = Mannit	L-Fucose ⁵	m-Inositol ⁶ Innosit
α-D-Glucose ³	D-Mannose ²	L-Glutaminsäure ³	Monomethylsuccinat ⁶
α-D-Lactose ³	D-Melibiose ⁶	L-Glutamin ⁶	Mucic Acid ² = Schleimsäure
Adonitol ⁵	D-Raffinose ⁶	L-Histidin ⁵	N-Acetyl-β-D-Mannosamin ⁵
α-Methyl-D-Glucosid ⁶	D-Ribose ⁵	L-Isoleucin ⁵	Oxalsäure ⁶
Amygdalin ⁵	D-Sorbitol ⁶ = Sorbit	L-Lactic Acid ⁴ =Milchsäure	Palatinose ⁵ = Isomaltulose

Arbutin ⁵	D-Trehalose ⁵	L-Leucin ⁵	Pektin (from Apple) ⁶ (1%)
Zitronensäure ⁵	D-Xylose ³	L-Lysin ⁶	Pektin (from Apple) ⁶ (2%; in 1:8 Ethanol)
Kreatin ³	Formic Acid ⁶ = Ameisensäure	L-Malic Acid ⁵ = L-Äpfelsäure	Putrescin ⁶
D-Alanin ⁶	Fumarsäure ⁶	L-Methionin ⁵	Pyruvat ⁶ = Brenztraubensäure
D-Galactose ⁶	Gentiobiose ⁵	L-Ornithin ¹	Salicin ⁵
D,L-Malic Acid ⁵ = D,L-Äpfelsäure	Glycerol ³	L-Phenylalanin ⁵	Succinic Acid ⁶ = Bernsteinsäure
N-Acetyl-D-Glucosamin ⁵	Glyoxylsäure ⁶	L-Prolin ⁵	Sucrose ⁶ = Saccharose
D-Arabinose ⁶	Inosin ⁵	L-Rhamnose ³	2'Desoxy-Thymidin ¹
D-Cellobiose ⁶	Lactose ³	L-Serin ⁵	Turanose ¹
D-Fructose ⁶	Lactulose ⁶	L-Threonin ⁵	Tween20 ⁴
D-Galacturonsäure ⁶	L-Alanin ⁶	L-Valin ⁵	Tween80 ⁶
D-Glucosamin ⁶	L-Arabinose ⁵	Maltitol ⁶	Uridin ⁶
D-Glucose-6-Phosphat	L-Arabitol	Maltose ⁵	γ-Amino Butyric Acid ⁶ = γ-Amino-Buttersäure
D-Glucuronsäure ⁵	L-Arginin ⁵		

Bezugsquellen:

¹Applichem, ²Fluka, ³Merck, ⁴Riedel-de Haen, ⁵Roth, ⁶Sigma-Aldrich

1.11. Geräte

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Name	Hersteller
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik
Schüttelinkubator	Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc.
Schüttelinkubator	CERTOMAT [®] MOII	Sartorius
Thermocycler	PCR Sprint Thermal Cycler	Thermo Electron Corporation
Spektrophotometer	BioPhotometer	Eppendorf
Sterilbank	Sterilwerkbank HERA-Safe	Heraeus
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech
Gelelektrophorese-Kammer	Class II Model 40-0911	Peqlab
Elektroporation	Multiporator	Eppendorf
UV-Kamera	Transilluminator	biostep
Tecan-Reader Spectra	Tecan	Tecan Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
CO ₂ -Inkubator	Hera Cell 150	Heraeus
Hybridisierungs-Ofen	HB-1000 Hybridizer	UVP Laboratory Products

1.12. Software

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software (biostep)

Clone Manager Clone5_NET

Ridawin (R-Biopharm AG)

1.13. Datenbanken

<http://www.kegg.jp/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.chemspider.com/>

<http://www.phenomicdb.de/>

2. Methoden

2.1. Kultivierung von Bakterien

2.1.1. Kultivierung von *Cronobacter sakazakii*

Der *C. sakazakii* ES5-Wildtyp wurde auf festem LB-Medium im Brutschrank oder in LB-Flüssigmedium im Schüttler (180-200 rpm) bei 37°C angezogen. Die Anzucht der Transposoninsertionsmutanten erfolgte unter Zusatz von Kanamycin (50 µg/ml).

2.1.2. Konservierung von Bakterien (Glycerinkultur)

- 1250 µl der ÜNK in ein Eppendorfgefäß überführen
- 250 µl 87% Glycerin zugeben, vortexen
- Lagerung bei -80°C

2.2. Molekulargenetische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Deletion in einer Mutante komplementiert und ausgewählte Transposoninsertionsmutanten erneut sequenziert um die Insertionsstelle zu überprüfen und die Stabilität der Transposoninsertion zu bestätigen.

2.2.1. Isolierung von DNA-Fragmenten

2.2.1.1. Präparation von genomischer DNA

- 1,5 ml ÜNK bei 16.000 g für 2 min abzentrifugieren
- Pellet in 400 µl Lyse-Puffer resuspendieren
- 100 µl Lysozym zugeben, invertieren und für 15 min auf Eis inkubieren
- Zugabe von 10 µl SDS und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml), invertieren
- Inkubation über Nacht bei 55°C im Hybridisierungssofen oder im Thermoblock (Rotation)
- Zugabe von 500 µl Isopropanol zur Fällung der DNA (invertieren)
- Mit gelber Spitze DNA entnehmen und in 96% Ethanol und 70% Ethanol (500 µl) waschen
- DNA lufttrocknen (Geruchprobe) und in 200-300 µl TE-Puffer pH 7,4 mit 1 µl RNase (10 mg/ml) lösen

- 1 h bei 37°C
- 100 µl abnehmen, Konzentration der Gesamt-DNA photometrisch messen, Ansatz bei -20°C lagern

2.2.1.2. Präparation von genomischer DNA (*quick version*)

- Bakterienmaterial vom Festmedium in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- in 200 µl A. dest. resuspendieren
- 5 min bei 100°C kochen
- 5 min bei 16.000 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und im Verhältnis 1:2 mit Roti-Chloroform II mischen (invertieren bis milchige Lösung entsteht)
- 10 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugieren
- obere wässrige Phase vorsichtig abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß geben

2.2.1.3. Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.3.1. Plasmidpräparation in kleinem Maßstab

- peqGOLD Plasmid Miniprepkit I
- Sigma Gen Elute™ Plasmid Miniprep-Kit

Vorgehen nach beiliegender Anleitung, Eluieren in 65 µl A. dest., Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch messen, Ansatz bei -20°C lagern.

2.2.1.3.2. HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* / *C. sakazakii*

Für die Klon Analyse nach Transformation:

- 1,5 ml Bakterienflüssigkultur in Eppendorfgefäß bei 16.000 g 5 min pelletieren
- Zellpellet in 0,3 ml P1 durch Vortexen resuspendieren (Alternative: Bakterienmaterial direkt von der Platte abnehmen)
- 0,3 ml P2 zugeben, 6x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren (bei *C. sakazakii*: 3 min)
- 0,3 ml P3 zugeben, 6x invertieren
- 10 min auf Eis inkubieren

- 10 min bei 16.000 g zentrifugieren, Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 600 µl Isopropanol zugeben, invertieren
- 20 min bei 16.000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol zugeben
- 10 min bei 16.000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet bei 70°C trocknen
- DNA in 20 µl A. dest. oder TE-Puffer resuspendieren

2.2.2. Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.2.2.1. Phenolextraktion

- zu 1 Vol. DNA-Lösung 1 Vol. Phenol-Chloroform zugeben, mischen
- 15 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugieren
- obere Phase abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Vorgang ggf. wiederholen
- Konzentrierung der DNA durch Alkoholfällung
- resuspendieren in A. dest. oder TE-Puffer

2.2.2.2. Alkoholfällung

- 1 Vol. DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 8,0 versetzen und mischen
- Zusatz von 6 µl Fällungszusatz Roti[®]-PinkDNA
- 2 Vol. 100% Ethanol zugeben und invertieren
- 20-30 min bei -20°C inkubieren
- 20 min bei 16.000 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet 2x mit 300 µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 16.000 g zentrifugieren
- Überstand entfernen, Pellet bei 70°C trocknen
- DNA in A. dest. oder TE-Puffer resuspendieren

2.2.2.3. Entsalzen von Plasmid-DNA

- Membranfilter (0,025 μm von Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben in einer mit A. dest. gefüllten Petrischale für 1 min equilibrieren lassen
- DNA auf den Filter geben und 20 min bei RT inkubieren
- gereinigte DNA von dem Filter abnehmen, für Elektroporation verwenden oder bei -20°C lagern

2.2.2.4. Konzentrationsbestimmung der DNA

Über die Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ kann die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung photometrisch bestimmt werden. Bei dieser Wellenlänge liegt das durch die aromatischen Ringe der Basen bedingte Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer ds DNA-Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$. Die Reinheit der Lösung wird durch die Ermittlung des Quotienten DNA-/Proteingehalt ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) bestimmt. Bei reiner DNA liegt der Quotient zwischen 1,7 und 2,0.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifisch bestimmte DNA-Fragmente genomischer DNA oder Plasmid-DNA in großer Anzahl zu vervielfältigen. Ermöglicht wird dies durch spezifische Oligonukleotid-Primer und hitzestabile DNA-Thermonukleasen, die aus den zugegebenen dNTPs das entsprechende Fragment amplifizieren.

Standard-PCR-Ansatz (50 μl)

- 2-100 ng Template
- 5 μl PCR-Puffer (10x)
- 3 μl MgCl_2 (25 mM)
- 1 μl dNTPs (40 mM)
- je 2 μl Primer (10 pmol/ μl)
- 0,1 μl Taq DNA-Polymerase (5 U/ μl)
- ad 50 μl A. dest.

Standard-PCR-Bedingungen

- | | | | | |
|---|----------------|----------------|------------|------------------------|
| - | 95°C | 5-10 min | 1x | initiale Denaturierung |
| - | 95°C | 30-60 s | } 25 - 30x | Denaturierung |
| - | T _A | 40 s | | Annealing |
| - | 72°C | t _E | | Elongation |
| - | 72°C | 5 min | 1x | finale Elongation |

Die Annealingtemperatur T_A wird der Schmelztemperatur der spezifischen Primer angepasst. Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Anzahl und der Art der Basenpaare und kann mit Hilfe folgender Formel bestimmt werden: $T_M = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$. Die Annealingtemperatur liegt 0,5-5°C unter diesem Wert. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Segments und der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase. Die *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert 1 kb in 1min.

2.2.3.1. PCR mit ganzen Zellen als Template

- 1-3 Kolonien von einer über Nacht bebrüteten Festagar-Platte mit Selektivmedium in 100 µl A. dest. resuspendieren
- 10 min bei 100°C kochen
- 2 min bei 10.000 g zentrifugieren
- Überstand abnehmen und als Template einsetzen

Das PCR-Produkt kann bei 4°C oder -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden oder direkt mittels Agarosegelelektrophorese charakterisiert werden.

2.2.4. Techniken zur Charakterisierung von DNA Molekülen**2.2.4.1. Hydrolyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für den Endonuklease-Verdau wurden je nach Sequenz die entsprechenden Enzyme ausgewählt, die Konzentration der eingesetzten DNA festgelegt und nach Herstellerangaben verfahren. Angesetzt wurde der Verdau im Gesamtvolumen von 20 µl oder 40 µl. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 9 (1.5) aufgeführt.

Standard-Restriktionsansatz (20µl)

- x µl DNA
- 2 µl Puffer CutSmart (10x)
- 1 µl Enzym 1
- 1 µl Enzym 2
- ad 20 µl A. dest.

Inkubation für 2-4 h bei 37°C, eventuell anschließende Enzymdeaktivierung nach Herstellerangaben.

2.2.4.2. Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese kann DNA entsprechend der Fragmentlänge (Anzahl der Basenpaare) aufgetrennt und somit charakterisiert werden. Aufgrund der Phosphatreste ist DNA negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol. Je nach Konzentration des Agarosegels (0,8-1,5%) ist die netzartige Struktur dichter oder weniger dicht. Die dichte Netzstruktur im höherprozentigen Gel führt durch ihren größeren mechanischen Widerstand zu einer geringeren Wandergeschwindigkeit der DNA. Kurze Fragmente werden daher in höher konzentrierten Agarosegelen aufgetrennt und große Fragmente in niedrig konzentrierten. Neben der Fragmentlänge spielt auch die Konformation eine Rolle: je mehr Raum ein DNA Fragment einnimmt, desto mehr Widerstand erfährt es und desto langsamer ist die Wandergeschwindigkeit.

- Agarose in TAE-Puffer in der gewünschten Konzentration aufkochen
- in einen Gelträger mit eingesetztem Kamm gießen und aushärten lassen (20 min)
- in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit Gel-Lade-Puffer (6x) versetzen und die Geltaschen mit den Proben beladen; zusätzlich Marker mit definierten Bandengrößen beidseitig auftragen
- Laufbedingungen: Auftrennung bei einer Spannung von 90-120 V (je nach Gelkonzentration), 400 mA, 80 W
- Färben des Gels mit Ethidiumbromidlösung, anschließend kurz im Wasserbad schwenken
- unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) fotografieren

2.2.5. Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.5.1. Dephosphorylierung des Vektors

Standard-Ansatz (100 µl)

- 2 µl Antarctic Phosphatase (5 i.E.)
- 10 µl Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (10x)
- 88 µl Vektor-DNA

- Inkubation bei 37°C für 15 min
- Enzymdeaktivierung bei 70°C, 5 min

2.2.5.2. Aufreinigung

Das zu klonierende PCR-Fragment (Insert) und der Vektor werden aufgereinigt und anschließend die DNA-Konzentration bestimmt. Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit QUIquick® PCR Purification Kit von Qiagen.

2.2.5.3. Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Ligation der hydrolysierten, genomischen DNA mit der geschnittenen und dephosphorylierten Vektor-DNA erfolgte im 40 µl Ligationsansatz im Verhältnis (Vektor:Insert) 1:3 und 1:5.

Standard -Ansatz (40 µl)

- geschnittene Vektor-DNA
- geschnittene Insert-DNA
- 4 µl Ligase-Puffer (10x)
- 2 µl T4-DNA-Ligase
- ad 40 µl A. dest.

- Inkubation für 2-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C
- Hitzeinaktivierung der T4-DNA-Ligase für 10 min bei 60°C

2.2.6. DNA-Transfer

2.2.6.1. Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl_2 -Methode

- 1 ml ÜNK in 50 ml LB-Vollmedium überimpfen
- bei 37°C im Schüttler bis zur OD_{600} von 0,5-0,8 inkubieren; entspricht dem Titer von ca. 2×10^8 /ml (2-4 h)
- 7 min bei 4.600 g und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 7 min bei 4.600 g und 4°C zentrifugieren
- Pellet vorsichtig in 2 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendieren
- 15 min auf Eis inkubieren
- zu 2 ml Zellsuspension 292 µl 87% Glycerin zugeben und resuspendieren
- Zellen à 200 µl in gekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren, bei -80°C lagern

2.2.6.2. Transformation CaCl_2 -kompetenter Zellen

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- 100 µl Zellen mit 10 µl Ligationsansatz mischen, zusätzlich Kontrollansatz mit 2 µl Leervektor
- 30-60 min auf Eis inkubieren
- 2,5 min Hitzeschock bei 42°C
- 5 min auf Eis inkubieren
- 0,7 ml LB-Medium zugeben, invertieren
- 30-60 min bei 37°C und 800 rpm inkubieren
- 50 µl und 100 µl auf Selektionsmedium ausplattieren
- 2 min bei 16.000 g zentrifugieren, Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- über Nacht bei 37°C inkubieren

2.2.6.3. Herstellung elektrokompenter Zellen

- 250 ml LB-Medium mit 2,5 ml ÜNK animpfen
- bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,75 im Schüttler inkubieren (2-2,5h)
- Zellsuspension 15 min auf Eis stellen
- alle weiteren Schritte bei 0°C durchführen, alle Lösungen vorkühlen
- 250 ml Zellsuspension 20 min bei 4.600 g bei 4°C zentrifugieren

- Überstand und Rücklauf verwerfen
- Zentrifugengefäß 2x mit A. dest. vorsichtig ausschütteln, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet vorsichtig in 5 ml A. bidest resuspendieren
- 250 ml A. bidest zugeben, durch Vortexen mischen
- 20 min bei 4.600 g bei 4°C zentrifugieren, Überstand sofort entfernen
- Pellet im Rücklauf mit einer Pipette resuspendieren
- Zellsuspension auf zwei 40 ml-Zentrifugengefäße aufteilen
- 25 ml 15% Glycerin zugeben, mischen
- Zellen 20 min bei 4.600 g bei 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 15% Glycerin resuspendieren
- Zellen à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- Aliquots sofort verwenden oder bei -80°C lagern

2.2.6.4. Transformation elektrokompenter Zellen

Vor der Durchführung der Elektroporation muss der Ligationsansatz mittels Millipore Membran entsalzt werden (entfällt, wenn zu transformierende DNA in A. dest. gelöst ist). Es werden 5-10 µl des entsalzten Ligationsansatzes mit 40-50 µl kompetenter Zellen gemischt.

- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- DNA und Elektroporationsküvette (d=2 mm) auf Eis vorkühlen
- kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA mischen und in die Elektroporationsküvette geben
- 30-60 s auf Eis inkubieren
- Küvette von außen abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen: Spannung (V) 1.700 V, Zeitkonstante (τ) 5 ms
- sofort 1 ml SOC-Medium zugeben, mischen
- den Inhalt der Küvette in ein Eppendorfgefäß geben
- 1 h bei 37°C unter Schütteln (800 rpm) inkubieren
- 50 µl und 100 µl auf je eine Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattieren
- Zellen 2 min bei 16.000 g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- über Nacht bei 37°C inkubieren

2.3. Wachstumsanalysen

2.3.1. Wachstumsanalyse von Transposonmutanten im Vergleich zum Wildtyp *C. sakazakii* ES5

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhalten der Transposonmutanten und um zu überprüfen, ob bei manchen Stämmen die Mutation zu einer massiven Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels führt, wurden zunächst alle Mutanten in LB-Vollmedium unter Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin bei 37°C und 180 rpm für 10 Stunden angezogen. Als Kontrolle wurde stets der Wildtyp mitinkubiert.

- 1 Kolonie in 10 ml LB (Mutante: LB/Kan50) animpfen und bei 37°C und 180 ü.N. inkubieren
- photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600})
- Berechnung der gewünschte Start-OD
- $1 / OD_{600\text{aktuell}} \times \text{gewünschte Start-OD} = \text{Wert/ml}$
- pro Bakterien-Stamm 3x-Ansatz in je 50 ml LB Flüssigmedium (Mutante LB/Kan50) mit Start-OD=0,01 ansetzen: ÜNK Wert/ml x 50 zugeben
- Messung der OD_{600} über 10 h; zunächst stündlich, ab $OD_{600} > 0,1$ halbstündlich

2.3.2. Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Durch die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei der Wellenlänge von 600 nm kann in einer Flüssigbakterienkultur die Anzahl der Bakterien detektiert werden. Als Referenz dient das sterile Medium, das für die Anzucht verwendet wurde. Abhängig vom Phänotyp der Bakterienstämme, kann der Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der entsprechenden CFU (*colony forming unit*) variieren, da die Lichtabsorption nicht nur von der Anzahl der Bakterien, sondern auch von der Pigmentierung und der Ausbildung von Aggregaten abhängig ist. Der Vergleich der photometrisch bestimmten Wachstumskurven verschiedener Stämme muss daher unter Vorbehalt erfolgen.

In dieser Arbeit wurde bei drei Stämmen (Wildtyp ES5, 2_1 und 2_1 pUC19-*crtY*) zusätzlich zu der photometrischen Messung stündlich die Kultur auf Festmedium ausplattiert, über Nacht inkubiert und die CFU bestimmt.

Gewichteter Mittelwert:

Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten einer Flüssigkultur wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des gewichteten Mittelwerts bestimmt, bei dem die niedrigere Verdünnungsstufe auf Grund des geringeren Unsicherheitsfaktors stärker gewichtet wird. Zunächst wird eine Verdünnungsreihe (10er Stufen) angelegt und mindestens zwei der Verdünnungsstufen ausplattiert, bei denen zwischen 10 und 300 Kolonien zu erwarten sind. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Kolonien gezählt und die Summe aller Kolonien durch einen Faktor geteilt, der sich wie folgt zusammensetzt: Die Anzahl der Stellen entspricht den ausgewerteten Verdünnungsstufen, also bei zwei Verdünnungsstufen eine zweistellige Zahl. Die Höhe der Ziffer entspricht der Anzahl der ausgezählten Platten, d.h. bei dreifachem Ausplattieren die Ziffer 3. Anschließend wird mit dem Kehrwert der höchsten ausgewerteten Verdünnungsstufe multipliziert, z.B. bei der Verdünnungsstufe 10^{-5} mit 10^5 . Im letzten Schritt wird mit dem Plattenfaktor: 1000 μl / durch ausplattiertes Volumen multipliziert.

$$\text{Gewichteter Mittelwert} = \frac{\sum_{\text{Kolonien}} \times \text{Plattenfaktor}}{\text{spezifischer Faktor} \times \text{höchste Verdünnungsstufe}}$$

2.3.3. Bestimmung der CFU in der Infektionslösung I

Um im Gentamycin-Assay die Infektion mit einer bestimmten MOI (Bakterienzahl / eukaryotische Zelle) durchführen zu können, wurde für den Wildtyp und die untersuchten Mutanten vorab die CFU/ml in der Infektionslösung I, dem 2% Inokulums (I.O.) nach 2 h Inkubation bei 37°C und 200 rpm, bestimmt.

- je 1 Kolonie von *C. sakazakii* bzw. Transposoninsertionsmutante in 5 ml LB / LB/Kan50 animpfen
- 17 h bei 37°C und 200 rpm inkubieren
- 2%iges Inokulum von der ÜNK in vorgewärmtem LB bzw. LB/Kan50 ansetzen
(BF14: 8% I.O., BF15: 6% I.O., da diese Stämme im 2% I.O. innerhalb von 2 h nicht ausreichend anwachsen)
- 2 h bei 37°C und 200 rpm inkubieren
- Verdünnungsreihe bis 10^{-6} anlegen und je 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} auf jeweils 3 LB- bzw. LB/Kan50-Platten ausplattieren (BF1 und 89_1 zusätzlich 10^{-4})

- ü.N. im Brutschrank bei 37°C inkubieren
- Kolonien auszählen und über den gewichteten Mittelwert die CFU für den Wildtyp und die Mutanten bestimmen.

Die CFU-Bestimmung wurde für jeden Stamm 3x durchgeführt und anschließend die durchschnittliche CFU/ml im 2% Inokulum nach 2-stündiger Inkubation ermittelt, die dann zur Berechnung der MOI in den Infektionsversuchen herangezogen wurde.

2.3.4. pH-Wert-Untersuchung bei *C. sakazakii*-Stämmen im Wachstumsverlauf mit und ohne Glucose

Der Austausch von H^+ -Ionen erfolgt unter anderem über das Flagellen-Sekretionssystem und könnte daher bei Mutanten mit beschädigten oder fehlenden Flagellen gestört sein. Dies wurde an Hand ausgewählter Mutanten überprüft.

- pH-Wert-Messung des steril-filtrierte Überstands der ÜNK ausgewählter Mutanten und des Wildtyps; ÜNK in LB + 0,5% Glucose
- ÜNK (LB bzw. LB/Kan50) in 50 ml LB bzw. LB/Kan50 1:100 verdünnen (am wenigsten dichte ÜNK als Start-OD₆₀₀ wählen); pro Stamm je 2 Ansätze
- zu jeweils einer Tagkultur je Bakterienstamm Glucose steril zugeben (Endkonzentration 0,5%)
- Inkubation bei 37°C und 180-200 rpm
- alle 30 min 1,8 ml entnehmen, bei 16000 g für 2 min zentrifugieren, Überstand sterilfiltrieren und den pH-Wert messen
- parallel die OD₆₀₀ zu jedem Zeitpunkt messen (Messung über 6 h)

2.4. Motilitätsassay

Zur Überprüfung der Motilität des *C. sakazakii* Wildtyps und einzelner Transposoninsertionsmutanten wurden Weichagar-Platten zentral beimpft und bei 37°C für 48-60 h inkubiert.

2.4.1. Motilitätsanalyse im Weichagar

- Platten aus LB mit 0,3% bzw. 0,6% Agar (Mutanten: LB/Kan50) herstellen
- 1 Kolonie von *C. sakazakii* bzw. der Transposonmutanten in 5 ml LB bzw. LB/Kan50 animpfen und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubieren
- Injektion von 1 µl ÜNK mittig in runde LB- bzw. LB/Kan50-Platte oder mittig in eines von 9 Feldern (quadratische Platte)
- Platten bei 37°C inkubieren, Erschütterung und Bewegung vermeiden
- Radiusveränderung regelmäßig kontrollieren und dokumentieren

2.4.2. Motilitätsanalyse im Weichagar unter Zusatz von Tween 80

- vor Gießen der Platten wurde dem Medium 0,1% bzw. 0,02% Tween 80 zugegeben und wie unter 2.4.1 weiter vorgehen.

2.4.3. Motilitätsanalyse im Weichagar unter Zusatz von sterilfiltriertem Überstand aus einer *C. sakazakii*-WT-Flüssigkultur

- aus einer *C. sakazakii* ES5 WT-ÜNK 50 ml LB Tagkultur in der optischen Dichte von OD₆₀₀=0,1 animpfen (Mehrfach-Ansatz)
- bei 37°C und 180-200 rpm bis OD₆₀₀ von 0,5/ 0,6/ 0,8/ 1,0 inkubieren
- nach Erreichen der gewünschten OD die Tagkultur in Greiner-Röhrchen überführen, bei 4.600 g für 10 min zentrifugieren und den Überstand sterilfiltrieren
- 50 ml LB mit 0,6% Agar autoklavieren und nach Abkühlen auf ca. 40°C 50 ml vom steril filtrierten Überstand (jeweils von einer Tagkultur einer bestimmten OD) zugeben
- wie unter 2.4.1 beschrieben beimpfen und die Veränderungen in der Motilitätszone protokollieren.

2.5. Colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von metabolisierbaren Kohlenstoffquellen

Das Verfahren zur Bestimmung der verstoffwechselbaren Substrate basiert auf der irreversiblen Reduktion des farblosen Redox-Farbstoffs Tetrazoliumviolet zu purpurnem Formazan durch respiratorische Aktivität, die sich durch die Verwertung der eingesetzten Substrate entwickelt und colorimetrisch messbar ist.

- 1 Kolonie von *C. sakazakii* bzw. der Transposonmutanten in 10 ml LB bzw. LB/Kan50 animpfen und Inkubation bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubieren
- ÜNK bei 4600 g für 10 min zentrifugieren
- Pellet in PBS waschen, Überstand verwerfen
- Pellet in 3 ml IF-MM resuspendieren und OD₆₀₀ messen (1:50 verdünnt)
- optische Dichte
- 12 ml Bakterien-IF-MM-Lösung mit OD₆₀₀=0,3 aus Bakterien-Suspension und IF-MM-Medium herstellen
- 90 µl/Well an Bakterien-IF-MM-Lösung in einer 96-Well-Platte vorlegen
- 0,05 M Substratlösungen (Kohlenstoffquellen) in A. dest. ansetzen und steril filtrieren
- 10 µl des Substrates/Well zu der Bakterien-Lösung pipettieren (je 1 Well pro Substrat); nicht belegte Wells dienen als Leerwert
- 48 h bei 37°C in einer Box mit angefeuchteten Tüchern inkubieren
- Messung der Extension bei OD₆₂₀ nach 24 h und 48 h im Tecan-Reader
Spektra

2.6. Zellkultur

2.6.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zelllinien wurden in den entsprechenden Medien im begasten Zellkulturbrutschrank bei 7% CO₂ und 37°C kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Die dabei benutzten Puffer und Medien wurden vorab auf Raumtemperatur erwärmt.

- Medium abnehmen, 2x mit 10 ml PBS waschen
- Monolayer mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung benetzen (pro 80 cm²-Zellkulturflasche)

Makrophagen werden nach dem Waschen durch mechanisches Abkratzen mit Hilfe eines Zellkultur-Schabers in frischem Komplettmedium abgelöst

- 5 min bei 37°C inkubieren, das Ablösen der Zellen makroskopisch und mikroskopisch überprüfen
- 10 ml Komplettmedium zugeben
- durch Auf- und Abpipettieren Zellen resuspendieren und in Greiner-Röhrchen überführen
- 5 min bei 50 g zentrifugieren (Makrophagen für 5 min bei 200 g)
- Zellpellet in frischem Komplettmedium durch Auf- und Abpipettieren gut resuspendieren
- Zellsuspension mit frischem Komplettmedium verdünnt in neuen Zellkulturflaschen aussäen (je nach Zelllinie zwischen 1:2 und 1:12)
- Zellen durch vorsichtiges Schwenken (Kreuzbewegung in der Horizontalen) in der Kulturflasche gleichmäßig verteilen
- im Zellkulturbrutschrank bei 7% CO₂ und 37°C inkubieren
- in den ersten 4-6 h adhären die Zellen und dürfen daher keinen Scherkräften ausgesetzt werden

2.6.2. Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen

2.6.2.1. Einfrieren

- Zellen vom Flaschenboden ablösen (mit Trypsin oder mechanisch)
- Zellsuspension abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in Lösung A resuspendieren (0,75 ml pro 80 cm²-Zellkulturflasche)
- Lösung B (0,75 ml pro 80 cm²-Zellkulturflasche) tropfenweise unter ständigem Schwenken des Greiner-Röhrchens zugeben
- Zellen à 1,5-1,8 ml in Kryoröhrchen aliquotieren
- über Nacht bei -80°C in eine Kryobox, anschließend bei -80°C lagern

2.6.2.2. Auftauen

- Zellen bei 37°C auftauen, sofort in 10 ml Kompletmedium überführen
- Zellsuspension abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in frischem Kompletmedium resuspendieren und in eine Zellkulturflasche überführen
- Zellen werden nach Erreichen der Konfluenz (Monolayer) das erste Mal passagiert

2.6.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die lebenden von den toten Zellen unterscheiden zu können werden die Zellen vor dem Auszählen mit dem Farbstoff Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran schnell ins Zellinnere und führt so zur Blaufärbung der toten Zellen. Lebende Zellen dagegen nehmen den Farbstoff nur sehr langsam auf und sind daher unter dem Mikroskop als helle Zellen deutlich von den toten blauen Zellen differenzierbar.

- 50 µl Zellsuspension mit 50 µl 0,1%iger Trypanblau-Lösung versetzen
- 10 µl in Thoma-Zählkammer und die lebenden Zellen auszählen: die vier diagonalen Quadrate und ein weiteres Eck-Quadrat
- Lebendzellzahl/ml berechnen:
$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times \text{Kammerfaktor (50000)}$$

2.6.4. Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Gelatine

Für die Kultivierung von HBMEC-Zellen wurden stets Zellkulturflaschen und 24-Well-Platten verwendet, die mit Gelatine beschichtet waren, da es für diese Zelllinie nicht bekannt ist, ob die Adhärenz an unbehandelten Oberflächen zur Veränderung oder zum Verlust wichtiger Zellmerkmale führt.

- mit 0,2%iger Gelatine den Boden des Zellkulturgefäßes benetzen (8 ml/80 cm² Zellkulturflasche, 200 µl/Well)
- 10 min bei 37°C inkubieren
- Zellkulturflasche bzw. 24-Well-Platte 3x durch die Bunsenbrennerflamme ziehen, überschüssige Gelatine absaugen
- erneut durch die Flamme ziehen, bis Newtonsche-Ringe zu erkennen sind
- beschichtete Flasche / Platte kann sofort verwendet werden

2.6.5. Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *C. sakazakii*-Stämmen

Die Untersuchungen der Kolonisationsfähigkeit (Adhäsions, Invasions und intrazelluläre Proliferation) der Transposoninsertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp in unterschiedlichen eukaryotischen Zelllinien wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des Gentamycin-Assays (Gentamycin Protection Assay) durchgeführt.

Nach Bestimmung der CFU zu den einzelnen Zeitpunkten, werden die Werte für Adhäsion, Invasion und Proliferation mit der Infektionslösung (t=0) verrechnet

$$\frac{\text{CFU/ml Zeitpunkt A/I/P}}{\text{CFU/ml Infektionslösung}}$$

und in das prozentuale Verhältnis zum mitgeführten Wildtyp-Stamm *C. sakazakii* ES5 gesetzt.

2.6.5.1. Gentamycin-Assay mit Caco-2-Zellen

- Aussäen der Caco-2-Zellen in 24-Well-Platten à 2,5 x 10⁵ Zellen/Well in je 1 ml Kompletmedium
- Zellen im Brutschrank bei 37°C / 7% CO₂ für 22-24 h inkubieren
- je 1 Kolonie vom WT bzw. der Mutante in 5 ml LB bzw. LB/Kan50 animpfen, bei 37°C und 200 rpm für 17 h inkubieren
- 2%iges Inokulum von der ÜNK herstellen und bei 200 rpm und 37°C für 2 h inkubieren
- Inokulum bei 2.095 g für 10 min abzentrifugieren
- Pellet mit FCS-freiem RPMI-Medium waschen (vortexen, bis Pellet vollständig gelöst ist)

- erneut bei 2.095 g für 10 min abzentrifugieren
in FCS-freiem RPMI resuspendieren → Infektionslösung I
aus Infektionslösung I und FCS-freiem RPMI Infektionslösung II mit
MOI=10 herstellen ($2,5 \times 10^6$ Bakterien sollen in 500 μ l pro Well
zugegeben werden; $1/\text{CFU} \times 2,5 \times 10^6$)
- Zellen 2x mit PBS waschen
- 0,5 ml/Well Infektionslösung zugeben
- aus restlicher Infektionslösung Verdünnungsreihe bis 10^{-4} anlegen und
Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} auf LB bzw. LB/Kan50-Platten
ausplattieren (t=0)
- Zellen bei 37°C/ 7% CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Adhäsion (t=30' p.i.)
 - 3x mit PBS waschen
 - Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes
Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführen
 - Lysat ½ Minute vortexen
 - Verdünnungsreihe bis 10^{-3} anlegen und die entsprechenden
Verdünnungsstufen auf LB Platten bzw. LB/Kan50-Platten
ausplattieren (WT: 10^{-3} , 10^{-2})
- nach 1,5 h p.i. Medium entfernen, 2x mit PBS waschen
0,5 ml/Well Gentamycin100-Lösung in FCS-freiem Medium zugeben
- Zellen bei 37°C/ 7% CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Invasion (2,5 h p.i.)
 - 2x mit PBS waschen
 - Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes
Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführen
 - Lysat ½ Minute vortexen
 - Verdünnungsreihe bis 10^{-2} anlegen und die entsprechenden
Verdünnungsstufen auf LB Platten bzw. LB/Kan50-Platten
ausplattieren (WT: 10^{-2} , 10^{-1})
- nach 2,5 h p.i. Medium entfernen
0,5ml/Well Gentamycin10-Lösung in FCS-haltigem RPMI zugeben
- Zellen bei 37°C/ 7% CO₂ im Brutschrank inkubieren

- Proliferation (7 h *p.i.*)
 - 2x mit PBS waschen
 - Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1%-Triton X-100 lysieren und gesamtes Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführen
 - Lysat ½ Minute vortexen
 - Verdünnungsreihe bis 10^{-3} anlegen und die entsprechenden Verdünnungsstufen auf LB Platten bzw. LB/Kan50-Platten ausplattieren (WT: 10^{-3} , 10^{-2})
- die LB- bzw. LB/Kan50-Platten über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend Kolonien auszählen und die CFU bestimmen

2.6.5.2. Gentamycin-Assay mit RAW-264.7-Zellen

- Aussäen der RAW-264.7-Zellen in 24-Well-Platten à $4,0 \times 10^5$ Zellen/Well in je 1 ml Kompletmedium
- Zellen im Brutschrank bei 37°C /7% CO₂ für 48 h inkubieren
- Herstellung der Infektionslösung I (siehe Caco-2-Assay)
- aus Infektionslösung I und FCS-freiem RPMI Infektionslösung II mit MOI=10 herstellen ($4,0 \times 10^6$ Bakterien sollen in 500 µl pro Well zugegeben werden; $1/\text{CFU} \times 4,0 \times 10^6$)
- Zellen infizieren (siehe Caco-2-Assay)
- Adhäsion ($t=30'$ *p.i.*): wie im Caco-2-Assay
- nach 45 min *p.i.* Medium entfernen, 2x mit PBS waschen, 0,5 ml/Well FCS-freies RPMI zugeben, 15 min inkubieren bei 37°C / 7% CO₂
- 1,0 h *p.i.* Medium entfernen
0,5 ml/Well Gentamycin-Lösung in FCS-haltigem Medium zugeben (100 µg/ml Gentamycin zu den Wells, die 2 h *p.i.* lysiert werden, 10 µg/ml Gentamycin zu den Wells, die erst nach 7 h *p.i.* lysiert werden)
- Zellen bei 37°C/ 7% CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Invasion (2,0 h *p.i.*) wie im Caco-2-Assay
- Proliferation (7,0 h *p.i.*) wie im Caco-2-Assay
- die LB- bzw. LB/Kan50-Platten über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend Kolonien auszählen und die CFU bestimmen

2.6.5.3. Gentamycin-Assay mit HBMEC-Zellen

- Aussäen der HBMEC-Zellen in mit Gelatine beschichtete 24-Well-Platten à $1,0 \times 10^5$ Zellen/Well in je 1 ml Kompletmedium
- Zellen im Brutschrank bei 37°C / 7% CO_2 für 48 h inkubieren
- Herstellung der Infektionslösung I (siehe Caco-2-Assay)
aus Infektionslösung I und FCS-freiem RPMI Infektionslösung II mit $\text{MOI}=10$ herstellen: $3,73 \times 10^6$ Bakterien sollen in 500 μl pro Well zugegeben werden, da nach 48 h pro Well durchschnittlich $3,73 \times 10^5$ HBMEC-Zellen vorhanden sind; $1/\text{CFU} \times 3,73 \times 10^6$ (wurde in Vortests ermittelt)
- Zellen infizieren (siehe Caco-2-Assay)
- Adhäsion ($t=30'$ *p.i.*)
 - 3x mit $\text{PBS}/\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ waschen
 - Zellen mit eiskaltem 1% Saponin lysieren und gesamtes Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführen
 - Lysat ½ Minute vortexen
 - Verdünnungsreihe bis 10^{-4} anlegen und die entsprechenden Verdünnungsstufen auf LB Platten bzw. LB/Kan50-Platten ausplattieren
- nach 1,5 h *p.i.* Medium entfernen, 3x mit $\text{PBS}/\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ waschen
0,5 ml/Well Gentamycin100-Lösung in HBMEC-Gentamycin-Medium zugeben
- Zellen bei 37°C / 7% CO_2 im Brutschrank inkubieren
- Invasion (2,5 h *p.i.*): Vorgehen wie zum Adhäsionszeitpunkt
- nach 2,5 h *p.i.* Medium entfernen
0,5ml/Well Gentamycin10-Lösung in HBMEC-Gentamycin-Medium zugeben
- 24-Well-Platten bei 37°C / 7% CO_2 im Brutschrank inkubieren
- Proliferation (2,5 h *p.i.*): Vorgehen wie zum Adhäsionszeitpunkt
- die LB- bzw. LB/Kan50-Platten über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend Kolonien auszählen und die CFU bestimmen

IV. ERGEBNISSE

1. Eigenschaften und Morphologie der *C. sakazakii* ES5-Transposoninsertionsmutanten

Um Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese von *C. sakazakii* zu gewinnen und um potentielle Virulenzfaktoren zu identifizieren, wurden aus einer Transposonmutantenbank (Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Universität Zürich) 28 Mutanten ausgewählt. Es handelt sich dabei um Tn5 Transposonmutanten von *Cronobacter sakazakii* ES5, einem klinischen Isolat. Als Selektionsmarker dient die Kanamycin-Resistenz, die den Mutanten vom auf dem Transposon lokalisierten *Kanamycin-resistance-gene* Tn903 verliehen wird. Die inaktivierten Gene der in dieser Arbeit untersuchten Transposoninsertionsmutanten kodieren für Proteine, die bei Pigmentbildung, Biofilmbildung und Serumresistenz eine Rolle spielen. Dabei handelt es sich um Transport- und Bindeproteine sowie Enzyme, die an Biofilmsynthese, Flagellenausbildung oder an spezifischen Stoffwechselwegen beteiligt sind (Abb. 2). Im Folgenden werden diese Transposonmutanten von *C. sakazakii* ES5 mit den ihnen zugeteilten Buchstaben-/Ziffernkombination abgekürzt, z.B. 2_1 bzw. BF5.

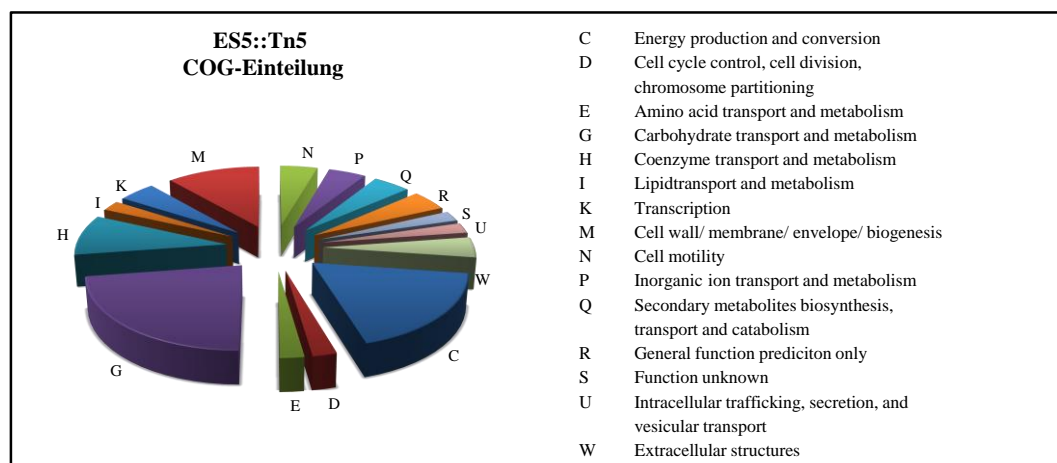


Abb. 2: Funktionelle Einteilung der Transposoninsertionsmutanten nach COG (Clusters of Orthologous Groups).

Bei einigen Mutanten führt die Mutation zu einer Koloniemorphologie, die in Farbe, Größe und Form sichtbar von der des Wildtyps (*C. sakazakii* ES5) abweicht (Abb. 3). Bei den Stämmen aus der Pigmentstudie fällt neben der

Abweichung in der Koloniefarbe zusätzlich die Varianz in der Größe der Kolonien auf. Mutante 1_4 z.B. bildet kleine Kolonien, während der Stamm 76_1 zu deutlich größeren Kolonien als der Wildtyp heranwächst. Die Serummutanten zeigen wildtypische Morphologie mit kleinen, gelben, glatten und glänzenden Kolonien. Die Pigmentierung der Biofilm-Mutanten ist ebenfalls wildtypisch gelb, allerdings sind bei diesen Mutanten deutliche Abweichungen in der Koloniegröße zu erkennen. Darüber hinaus fällt bei den großen Kolonien von den Stämmen BF4, BF9 und BF16 auf, dass diese stark glänzen. Die Mutante BF1 wächst dagegen während der gleichen Inkubationszeit nur zu kleinen und schwach gelben Kolonien heran.

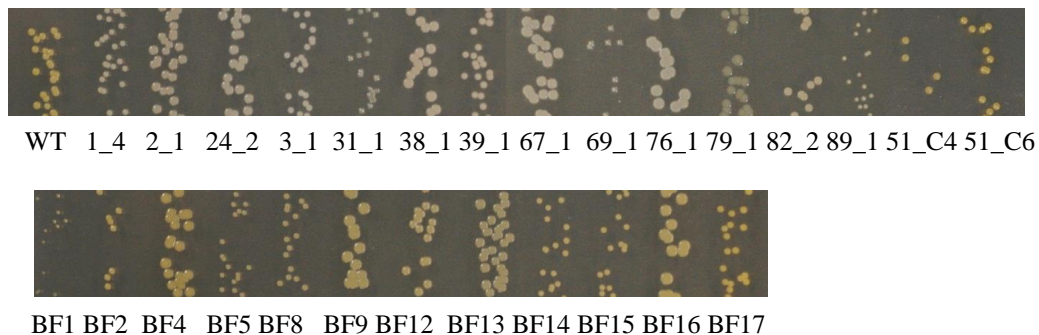


Abb. 3: Koloniemorphologie von *C. sakazakii* ES5 und den einzelnen Mutanten auf LB-Festmedium nach Bebrütung bei 37°C über Nacht.

2. Sequenzierung von Transposoninsertionsmutanten

Die Information, an welcher Stelle im Genom die Insertion des Transposons stattfand und welches Gen dadurch inaktiviert wurde, war für fast alle in dieser Arbeit untersuchten Transposoninsertionsmutanten bekannt. Lediglich bei dem von Hartmann *et al.* veröffentlichten Stamm BF16 gab es diesbezüglich keinerlei Informationen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Transposoninsertion im Stamm BF16 mittels Sequenzierung erneut analysiert. Um zu überprüfen, ob die Transposoninsertion über die Zeit stabil an derselben Stelle im Genom blieb, wurden zusätzlich weitere Mutanten, nämlich 82_2, 76_1, 69_1 und 2_1 ebenfalls auf die Insertionsstelle von Tn5 überprüft.

Aus den genannten Stämmen wurde zunächst die genomische DNA präpariert und parallel dazu aus einem *E. coli*-Stamm der pUC19-Vektor mittels eines Kits isoliert. Anschließend wurden sowohl die Vektor-DNA sowie die genomische DNA der *C. sakazakii*-Stämme mittels Endonuklease-Verdau mit *SphI* geschnitten. Nach der Enzymdeaktivierung bei 65°C wurde die Vektor-DNA

dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Zusätzlich wurde der Vektor über eine Säule aufkonzentriert. Im Anschluss daran wurde die Ligation des Vektors mit der *SphI*-hydrolisierten DNA der untersuchten Insertionsmutanten durchgeführt. Nach der Ligation und der Hitzeinaktivierung der T4-DNA-Ligase wurde der Ligationsansatz in calciumkompetente DH5 α -Zellen transformiert und nach einstündiger Inkubation bei 37°C auf Selektionsmedium (LB/Kan50) ausplattiert. Auf diese Weise konnten nur Klone erhalten werden, die ein transposonhaltiges DNA-Fragment im pUC19-Konstrukt beinhalten. Diese pUC19-Konstrukte wurden erneut aus den *E. coli*-Zellen isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe eines Transposon-spezifischen Primers KAN-2 RP-1 und lieferte eine 1.000-1.500 bp lange Sequenz, die eine Teilsequenz des Tn5-Transposons und die benachbarte genomische Sequenz der jeweiligen *C. sakazakii*-Mutante enthielt. Anschließend erfolgte der Abgleich der Sequenzen mit Hilfe des Clone-Manager-Programms mit der DNA-Sequenz des pUC19-Vektors, des Transposons sowie dem Genom von *C. sakazakii* BAA-894. Es ergab sich, dass bei der Transposoninsertionsmutante BF16 die Insertion im Bereich der Gene ESA_04207 und ESA_04208 vorliegt. Die exakte Position des Transposons ist bei 4.166.401 bp und somit ist das Gen ESA_04207 durch die Insertion unterbrochen. Dieses Gen codiert für die Subunit BcsC einer hypothetischen Zellulosesynthase. Die Analyse der Sequenzen der anderen pUC19-Konstrukte bestätigte die vorher ermittelte Insertionsstelle in den entsprechenden Genen (Tab. 1).

3. Komplementation und Charakterisierung der *crtY*-Mutante

Bei der Arbeit mit den Transposoninsertionsmutanten konnte beobachtet werden, dass sich eine der untersuchten Mutanten auf den LB/Kan50-Platten bei Lagerung bei Raumtemperatur und Tageslicht nach 3 Tagen (nach der vorherigen Inkubation ü. N. bei 37°C) von farblos zu rosarot, später zu rost-rot verfärbt (Abb. 4A). Bei der Mutante handelt es sich um den ES5-Stamm 2_1, der die Transposoninsertion in dem Gen ESA_00344 trägt (Johler et al., 2010). Dieses Gen kodiert für eine aus 391 Aminosäuren bestehende, hypothetische Lycopene- β -Cyclase mit einem Molekulargewicht von 43 kDa. Das Enzym ist in die

Carotinoid-Biosynthese involviert und führt die Zyklisierung des Lycopens zu β -Carotin durch (Lehner et al., 2006; Zhang et al., 2014; KEGG).

Unter den in dieser Arbeit untersuchten Mutanten befand sich zudem ein weiterer Stamm, nämlich Stamm 39_1, der in demselben Gen eine Insertion trägt. Bei dieser Mutante konnte allerdings selbst nach mehreren Tagen Inkubation bei Raumtemperatur und Tageslicht keine Verfärbung der weißen Kolonien festgestellt werden. Das Gen ESA_00344 ist 1.176 bp lang und befindet sich an Position 318.102-316.927 auf dem komplementären Strang des bakteriellen Chromosoms. Die Insertionsstelle der Mutante 2_1 liegt bei 317.733 bp relativ am Anfang des Gens, während das Transposon bei der 39_1-Mutante eher am Ende des Gens, nämlich an Stelle 317.009 bp, inseriert ist. Da sich die Gene ESA_00344 und ESA_00343 überlappen, könnte eine Insertion am Ende von ESA_00344 durchaus eine Auswirkung auf das Gen ESA_00343 haben, was die fehlende Pigmentierung der 39_1-Mutante erklären würde.

Vor den Komplementierungsarbeiten wurde der 2_1-Stamm zunächst überprüft. Zur Verifizierung wurde nach der Verfärbung zu rost-rot mittels Kolonie-PCR der Genus und die Spezies bestimmt. Die PCR wurde mit vier unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt: Das Bakterienmaterial stammte aus zwei Gefrierkulturen bzw. direkt von den rosa-gefärbten Kolonien von der Platte. *C. sakazakii* ES5 diente als Referenz. Die Charakterisierung der PCR-Produkte (Abb. 4) im Agarosegel zeigte eindeutig die Zugehörigkeit zum Genus *Cronobacter* und der Spezies *sakazakii*. Bei allen Proben ist ein 1.680 bp großes Fragment (Genus) bzw. ein 514 bp großes Fragment (Spezies) zu erkennen. Der Stamm 2_1 konnte eindeutig als *C. sakazakii* bestätigt werden.

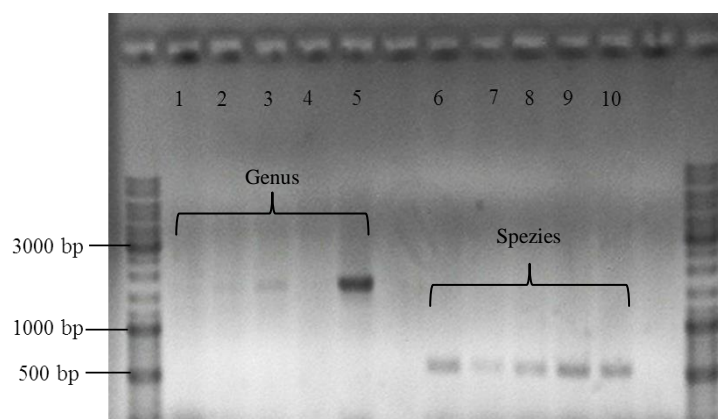


Abb. 4: Genus- und Spezies-PCR-Produkte zu *Cronobacter sakazakii*; M: 10 kb DNA-Marker (Fermenters); 1/6: Csa 2_1 aus Gefrierkultur I; 2/7: Csa 2_1 Gefrierkultur II; 3/8; 4/9: Csa 2_1 aus 3 Tage alter LB/Kan50-Platte; 5/10: Csa ES5

3.1. Konstruktion des Komplementationskonstruktes pUC19-*crtY*

Um die Funktion des *crtY*-Gens in *C. sakazakii* ES5 näher zu untersuchen und den Einfluss auf die Tenazität und Virulenz zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die *crtY*-Mutante komplementiert. Zunächst wurden vier potentiell geeignete Vektoren, nämlich pDG148-Stu, pTAQ, pCYC184 und pUC19, auf ihre Kompatibilität in *C. sakazakii* ES5 getestet. Alle vier Vektoren konnten erfolgreich in *C. sakazakii* ES5 transformiert werden und blieben auch nach mehrfacher Subkultivierung stabil in den Bakterienzellen erhalten. Die Transformationsrate war beim pUC19-Vektor am höchsten. Mit pDG148Stu und pUC19 wurde parallel weiter gearbeitet.

Die Amplifizierung des *crtY*-Gens erfolgte mit den konstruierten Primern crtYf und crtYr, die eine Schnittstelle für *Eco*RI- und *Bam*HI, enthielten. Als Template diente die präparierte genomische DNA von *C. sakazakii* ES5. Das 1.204 bp Amplifikat wurde anschließend mit *Eco*RI- und *Bam*HI gespalten und in den pUC19-Vektor kloniert. Die Amplifikation des *crtY*-Gens für die Klonierung in den pDG148-Stu-Vektor wurde mit denselben Primern crtYf und crtYr durchgeführt, die anstelle der Restriktionsschnittstellen die pDG148-Stu-spezifischen Adaptersequenzen enthielten (Joseph et al., 2001).

Bei der Transformation des pDG148Stu-*crtY*-Konstrukts in calciumkompetente *E. coli* DH5 α -Zellen wuchsen zwar 9 Klone auf dem Selektivmedium, nach der Klonanalyse zeigte sich allerdings, dass in den Klonen lediglich der Leervektor, d.h. pUC19-Vektor ohne das Insert vorhanden war.

Der Transformationsansatz aus pUC19-*crtY* und den calciumkompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen wurde auf LB/Amp150-IPTG-X-Gal-Agar ausplattiert. Neben der Antibiotika-Selektion steht hier die Blau/Weiß-Selektion als ein weiterer Indikator für Klone mit korrektem pUC19-Konstrukt zur Verfügung: Befindet sich das Insert an der gewünschten Stelle, d.h. in der multiplen Klonierungsstelle, ist das *lacZ*-Gen, das für die β -Galactosidase codiert, unterbrochen. Die β -Galactosidase spaltet den gelblichen Farbstoff X-Gal in Galactose und einen blauen Farbstoff. IPTG dient zur Induktion des Promotors, der das *lacZ*-Gen kontrolliert. Bei den blauen Kolonien findet weiterhin die Umsetzung von X-Gal zu Galactose und dem blauen Farbstoff statt, was bedeutet, dass diese Klone einen pUC19-Vektor ohne Insert beinhalten. Somit kann die Charakterisierung der Klone auf die weißen beschränkt werden (Abb. 5).

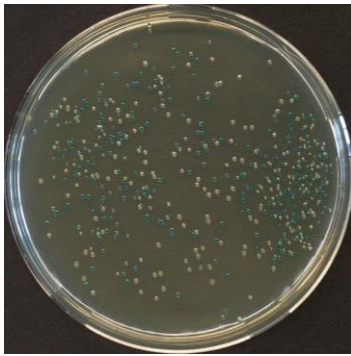


Abb. 5: Blau-/Weiß-Selektion. Transformation von pUC19-*crtY* in *E. coli* DH5 α ; ausplattiert auf LB/Amp150/X-Gal/IPTG Agar. Die jeweilige Blau oder Weißfärbung der einzelnen Kolonien ist deutlich erkennbar.

Insgesamt 150 weiße Kolonien wurden erneut auf Selektivmedium passagiert und die Plasmid-DNA der ersten 42 Klone isoliert. Nach der Restriktion mit den Endonukleasen *EcoRI* und *BamHI* zeigten 12 Klone in der anschließenden Gelelektrophorese die zwei zu erwartenden Banden bei 2.686 bp (pUC19, Leervektor) und 1.204 bp (*crtY*-Gen). Zur weiteren Überprüfung wurde die Plasmid-DNA der positiven Klone mit den Endonukleasen *PvuII* und *HindIII* hydrolysiert. Auch hier zeigten sich die zu erwartenden Banden von 183 bp, 1.322 bp und 2.364 bp Größe (Abb. 6).

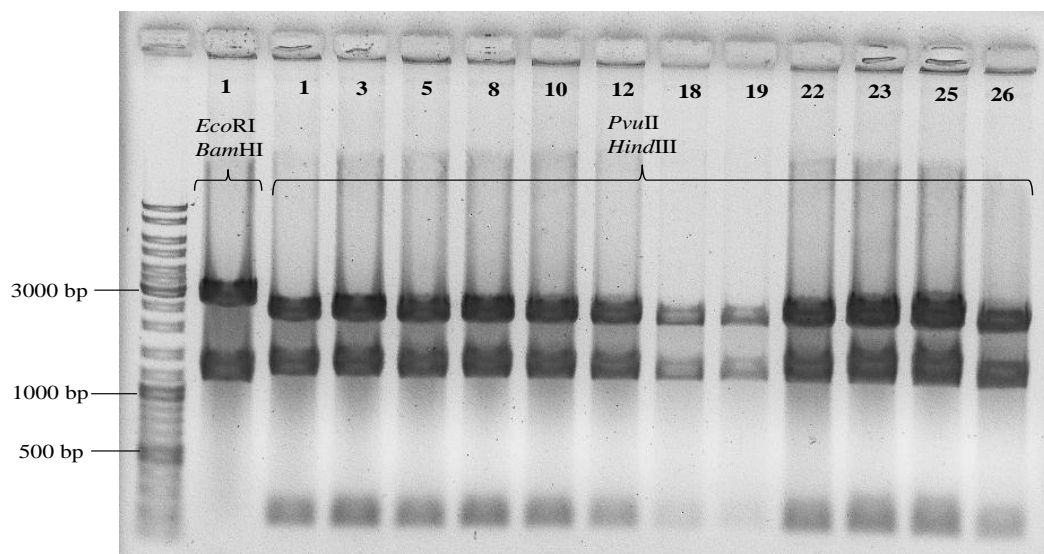


Abb. 6: Gelelektrophorese der Restriktionsansätze der Plasmid-DNA ausgewählter Klone aus der Transformation von pUC19-*crtY* in *E. coli* DH5 α (1% Agarose). Die jeweilige Ziffer entspricht der Nummer des entsprechenden Klons. Marker: 10 kb DNA-Marker (Thermofischer)

Klon 1 wurde für weitere Arbeiten verwendet. Die mit Hilfe eines MiniPrep-Kits isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Primern M13rev und *crtYr* zum Sequenzieren geschickt. Das Ergebnis bestätigte, dass das Komplementationskonstrukt pUC19-*crtY* aus dem Klon 1 das komplette *crtY*-Gen von *C. sakazakii* ES5 trägt.

3.2. Isolierung und Analyse der komplementierten *crtY*-Mutante

Nach der Sequenzierung des Komplementationsplamides pUC19-*crtY* aus dem *E. coli*-Klon 1 wurden dieses in elektrokompente 2_1::Tn5-Zellen transformiert. Auf dem Selektivmedium wuchs jeweils eine große Anzahl von Klonen. Je 8 Kolonien wurden erneut auf Selektivmedium passagiert und zusätzlich über Nacht in Flüssigmedium mit Kanamycin- und Ampicillinzusatz angezogen. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde sowohl die ungeschnittene, wie auch die mit *EcoRI* und *BamHI* hydrolysierte Plasmid-DNA per Gelelektrophorese analysiert. Die ungeschnittene DNA zeigt wie erwartet auf Grund der diversen dreidimensionalen Konformationen mehrere Banden im Gel, dabei liegen die Banden von pUC19-*crtY* deutlich höher als die Banden des pUC19-Leervektors. Die Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* brachte dagegen keine Ergebnisse, die DNA wurde von den Enzymen vollständig hydrolysiert, sodass keine Banden zu sehen waren (Abb. 7). Aus diesem Grund wurde die Plasmid-DNA von Klon 3 und 4 zusätzlich mittels Plasmid-Prep-Kit (Sigma) isoliert und erneut ungeschnitten und nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* im Agarosegel aufgetrennt. Auch hier war wieder das typische Bandenmuster der ungeschnittenen Plasmid-DNA zusehen, bei den Restriktionsansätzen war jedoch wie im vorigen Versuch nicht die gewünschten Fragmente, sondern erneut ein auf vollständige Degradation der DNA hindeutender Schleier zu sehen. Beim Endonukleaseverdau kam es offensichtlich zu einem unspezifischen Abbau der DNA. Um eine eventuell vorhandene Verunreinigung der Plasmidpräparation durch *C. sakazakii*-Nukleasen bzw. eine Kontamination in verwendeten Puffern und Lösungen ausschließen zu können, erfolgte zunächst eine Wiederholung des Versuchs mit frisch autoklaviertem und zusätzlich sterilfiltriertem Wasser sowie neu angebrochenem Puffer – mit gleichem Ergebnis. Im nächsten Schritt wurden zum einen verschiedene Puffer (Cut-Smart, Puffer4) getestet und zum anderen die Endonukleasen variiert. Auch hier war die unspezifische Hydrolyse der Plasmid-DNA zu beobachten (Abb. 7).

Es besteht die Möglichkeit, dass bei der Plasmid-Isolierung neben dem gewünschten Plasmid zusätzlich bakterielle Enzyme mitisoliert werden, die dann während der Inkubation beim Endonukleaseverdau zu einem unspezifischen Abbau führen können. Um diese Enzyme zu eliminieren, wurde erneut Plasmid-DNA, pUC19-Leervektor und pUC19-*crtY*, aus der komplementierten Mutante 2_1 isoliert, anschließend eine Phenolextraktion durchgeführt und mittels

Alkoholfällung die DNA aufkonzentriert. Die auf diese Weise behandelte Plasmid-DNA wurde in separaten Ansätzen sowohl mit *EcoRI/BamHI* als auch mit *PvuII* zwei Stunden verdaut. Dabei wurde die Inkubationszeit variiert: Jeweils 5 Minuten, 15 Minuten und zwei Stunden. Trotz Phenolextraktion und Alkoholfällung war nach zwei Stunden erneut das Bild der degradierten DNA zusehen. Nach 5 und 15 Minuten Inkubationszeit waren die zu erwartenden Fragmente noch erkennbar, wenn auch nur schwach (Abb. 7A). Da die bakterieneigene Enzyme durch die Phenolextraktion denaturiert und im weiteren Schritt entfernt worden waren, kann dies nun als Ursache für den unspezifischen Abbau ausgeschlossen werden. Scheinbar führen die für den Nachweis eingesetzten rekombinanten Endonukleasen zu diesem unspezifischen Abbau der DNA – vermutlich auf Grund des Methylierungsmusters von *C. sakazakii* ES5.

Jeder Bakterienstamm besitzt ein spezifisches Methylierungsmuster, das für die Identifikation von Mutter- bzw. Tochterstrang bei der DNA-Replikation wichtig ist, sowie die Differenzierung zwischen Eigen- und Fremd-DNA und gegebenenfalls die Eliminierung der Fremd-DNA ermöglicht. In der Regel beeinträchtigt dieses Methylierungsmuster die Enzymtätigkeit der Endonukleasen nicht, bei manchen Bakterienstämmen kommt es allerdings vor, dass aufgrund der Methylierung das spezifische Schneiden durch die Endonukleasen nicht funktioniert und es zu einem unspezifischen Abbau der DNA kommt. Um dies für *C. sakazakii* zu überprüfen, wurde pUC19-Vektor sowie pUC19-*crtY*-Konstrukt aus den Stämmen 2_1-pUC19 bzw. 2_1-pUC19-*crtY* isoliert und in den nicht-methylierenden *E. coli*-Stamm INV110 retransformiert. Nach erfolgreicher Transformation wurden die Plasmide pUC19 bzw. pUC19-*crtY* reisoliert und mit *EcoRI* und *BamHI* sowie mit *PvuII* geschnitten. Die Inkubationszeit wurde dabei erneut zwischen fünf Minuten und zwei Stunden variiert. Nach der Auftrennung der Restriktionsansätze mittels Gelelektrophorese zeigten sich bei allen Ansätzen die zu erwartenden Fragmente: Bei der Restriktion mit *EcoRI/BamHI* ein 2.686 bp großes Fragment für den pUC19-Leervektor und ein 1.204 bp großes für das *crtY*-Gen. Bei der Hydrolyse mit *PvuII* ergab sich ein 2.364 bp sowie ein 322 bp großes Fragment für den pUC19-Vektor und bei dem pUC19-*crtY*-Konstrukt ein 2.364 bp und ein 1.505 bp großes Fragment (Abb. 8B). Damit ist zum einen die erfolgreiche Transformation des *crtY*-Gens mittels pUC19-Vektor in die Mutante *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5 (2_1-Mutante) bestätigt, wie auch das spezifische

Methylierungsmuster von *C. sakazakii* ES5 als Ursache für die unspezifische Degradation der Plasmid-DNA durch die Endonukleasen identifiziert.

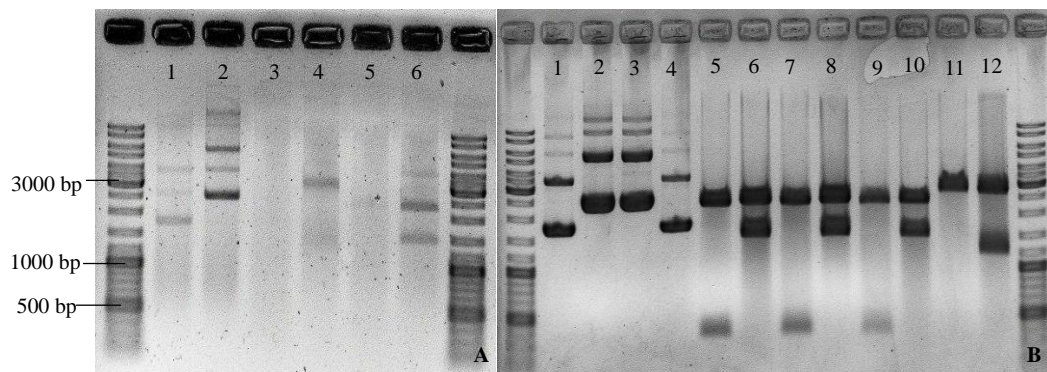


Abb. 7: Gelelektrophorese der ungeschnittenen Plasmide und der Restriktionsansätze; A: isoliert aus 2_1: 1) pUC19-Vektor ungeschnitten, 2) pUC19-*crtY* ungeschnitten, 3) pUC19 und 4) pUC19-*crtY* je *EcoRI* und *BamHI* Restriktion, 5) pUC19 und 6) pUC19-*crtY* mit *PvuII* verdaut, Restriktionsansätze wurden jeweils 5 Minuten inkubiert. **B: isoliert aus *E. coli* INV110:** 1) und 4) pUC19-Vektor ungeschnitten, 2) und 3) pUC19-*crtY* ungeschnitten, 5), 7) und 9) pUC mit *PvuII* geschnitten, 6), 8) und 10) pUC19-*crtY* mit *PvuII* geschnitten, 11) pUC19-Vektor und 12) pUC19-*crtY* je mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. 5) und 6) wurden 5 min inkubiert, 7) und 8) 15 min und 9) bis 12) 2 Stunden. (1% Agarose). Marker: 10 kb DNA-Marker (Fermenters)

3.3. Phänotypische Analyse der komplementierten *crtY*-Mutante

Die erfolgreiche Komplementierung der *crtY*-Mutante (2_1-Stamm) ist auch makroskopisch deutlich sichtbar: Auf LB/Kan50/Amp150-Selektivagar bildet die komplementierte Mutante wildtypisch gelbe Kolonien aus, während die Zellen des 2_1-Stammes sowie der 2_1-Stamm mit dem pUC19-Vektor rosafarbene Kolonien zeigen (Abb. 8).

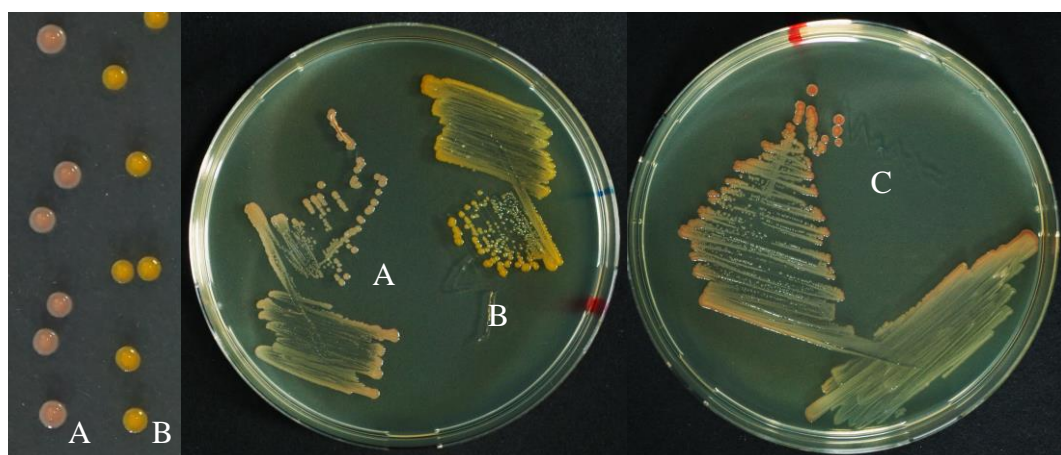


Abb. 8: Koloniemorphologie von ES5*crtY*::Tn5/pUC19 (A), von ES5*crtY*::Tn5/pUC19 -*crtY* (B) und den ES5*crtY*::Tn5 (2_1-Mutante) (C).

Nährboden: A und B: LB/Kan50/Amp150; C: LB/Kan50. Inkubation über Nacht bei 37°C und 4 Tage (mittlere Platte) bzw. 6 Tage bei Raumtemperatur.

Auch die im Laufe der Inkubation bei Raumtemperatur immer intensiver werdende Pigmentierung der Stämme ist bei der 2_1-Mutante, der komplementierten 2_1 Mutante, dem Kontrollstamm mit dem Leervektor und dem Wildtyp deutlich zu sehen. In Abbildung 9 sind die vier Stämme nach einem, drei und sieben Tagen Inkubation bei Raumtemperatur dargestellt.

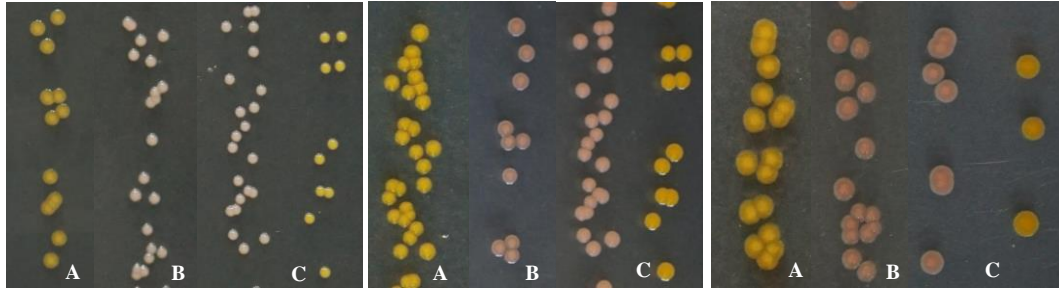


Abb. 9: Koloniemorphologie der *C. sakazakii*-Stämme (jeweils von links nach rechts): WT ES5, ES5 $crtY::Tn5$, ES5 $crtY::Tn5/pUC19$ und ES5 $crtY::Tn5/pUC19-crtY$ Mutante.

Nährboden: A und B: LB/Kan50/Amp150; C: LB/Kan50. Inkubation über Nacht bei 37°C und 4 Tage (mittlere Platte) bzw. 6 Tage bei Raumtemperatur.

In Abbildung 10 A wird an Hand von vier Beispielen die Varianz in der Koloniemorphologie der Transponinsertionsmutanten deutlich. Von links nach rechts: Kolonien von zwei wildtypisch gelb gefärbten Mutanten: die erste bildet große, runde Kolonien, die zweite kleine, glatte, glänzende Kolonien. An dritter Stelle eine Pigmentmutante mit farblosen, glatten, runden Kolonien und ganz rechts die kleinen, glänzenden, rosaroten Kolonien der Mutante 2_1.

Um zu überprüfen, ob das Pigment im Cytosol angereichert ist oder nach außen abgegeben wird, wurden jeweils mehrere Kolonien des Wildtyps, der 39_1-Mutante und der 2_1-Mutante von den Agar-Platten abgenommen, in PBS resuspendiert und anschließend zentrifugiert. In Abbildung 10 C ist eindeutig zu sehen, dass der Überstand klar ist und das Pellet gefärbt. Das bedeutet, dass sich das Pigment im Cytosol befindet und es sich bei dem roten Pigment um eine Zwischenstufe des gelben Pigments handelt.

Da die Verfärbung der Mutante 2_1 von farblos zu rosa erst nach drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur und Tageslicht auftritt, scheint diese temperatur- und lichtabhängig zu sein. Bei 37°C und Dunkelheit zeigte sich selbst nach zweiwöchiger Inkubation keine rötliche Färbung. Auch bei 4-10°C blieb die Mutante farblos. Bei Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit kam es zu einer im Vergleich zum Tageslicht verzögerten Rosa-Färbung. In der Flüssigkultur zeigte sich auch nach mehrtägiger Inkubation bei Raumtemperatur keine deutliche Rotfärbung. Nach Zentrifugation konnte jedoch eine dezente rosa-Färbung des

Pellets erkannt werden. Die mikroaerophilen Bedingungen scheinen somit die Pigmentbildung zu fördern. Entscheidend für die Pigmentbildung ist nach bisherigen Erkenntnissen die Temperatur von 20-22°C.

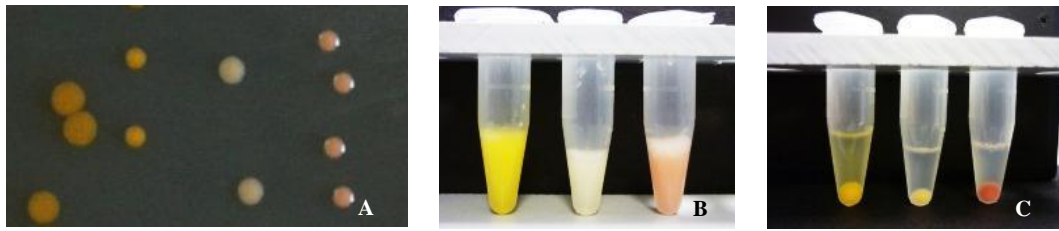


Abb. 10: A: Koloniemorphologie von *C. sakazakii* ES5-Stämmen nach 5 Tagen auf LB-Medium B: Verfärbung der Zellsuspension (in PBS) von *C. sakazakii* ES5 (WT), 39_1- und 2_1-Mutanten, die von einer LB-Platte abgenommen wurden. C: Pellets wurden nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 16.000 g erhalten.

3.4. Überprüfung der Inkompatibilität von pUC19-*crtY* in *C. sakazakii* ES5

Um zu überprüfen ob das Konstrukt pUC19-*crtY* stabil in der *C. sakazakii* ES5::Tn5 2_1 Mutante verbleibt, wurde die rekombinante Mutante über Nacht zum einen in LB-Flüssigmedium mit Ampicillin- und Kanamycin-Zusatz als Selektionssubstanz sowohl für den Vektor, wie auch für die ursprüngliche Mutation angezogen, sowie in LB-Flüssigmedium ausschließlich mit Kanamycin. Auch nach mehreren Subkultivierungen konnte in der Kultur ohne den durch Ampicillin-verursachten Selektionsdruck nach Ausplattieren auf LB/Amp150/Kan50-Festmedium keine Abweichung in der CFU im Vergleich zu der Kultur mit permanentem Selektionsdruck festgestellt werden. Mit einem zusätzlich durchgeführten Endonukleasen-Verdau nach Isolierung der Plasmid-DNA aus den beiden Flüssigkulturen konnte verifiziert werden, dass das Komplementationskonstrukt stabil in der 2_1-Mutante erhalten bleibt.

Dies bedeutet, dass die Plasmide von *C. sakazakii* ES5 einen anderen Replikationsursprung besitzen, als das transformierte Komplementationskonstrukt. Der pUC19-Vektor ist also mit den Plasmiden von *C. sakazakii* ES5 kompatibel. Wäre der Replikationsursprung ähnlich, käme es aufgrund der Konkurrenz um das Replikations- und Verteilungssystem der Zelle zum Verlust des fremden bzw. des kleinsten Plasmids.

3.5. Wachstumsanalyse der komplementierten *crtY*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp *C. sakazakii* ES5 und der *crtY*-Insertionsmutante

Die komplementierten *crtY*-Mutante ES5*crtY*::Tn5/pUC19-*crtY* wurde hinsichtlich ihres Wachstums in LB-Vollmedium (LB/Kan50/Amp150) überprüft. Als weitere Kontrollen dienten hier neben dem Wildtyp ES5 und der Transposoninsertionsmutante 2_1 dieselben Stämme mit dem pUC19-Vektor (Abb. 11). Im Zuge dessen wurde auch das Wachstumsverhalten der Deletionsmutante *C. sakazakii* ES5 Δ *ompA* analysiert. Diese Mutante diente in den Infektionsversuchen als Kontrolle, weil die Deletion des *ompA*-Gens bei *C. sakazakii* zur Attenuation der Adhäsion und Invasion in eukaryotischen Zellen führt.

Das Wachstum der Transposoninsertionsmutante 2_1 ist leicht erhöht und stimmt mit dem Ergebnis der unter Kapitel 4 beschriebenen Versuche überein. Die Kontrollstämme, mit dem pUC19-Vektor, weisen im Vergleich dazu leicht vermindertes Wachstum auf, was auf den Zusatz des Selektionsmarkers Ampicillin zurückzuführen ist. Die komplementierte Mutante 2_1 wächst dagegen wildtypisch. Bei der Deletionsmutante ES5 Δ *ompA* ist ebenfalls eine leichte Wachstumshemmung zu sehen, die durch die Zugabe von Chloramphenicol begründet ist. Bei der Deletionsmutante ES5 Δ *ompA* wurde das *ompA*-Gen durch eine Chloramphenicol-Resistenz ausgetauscht.

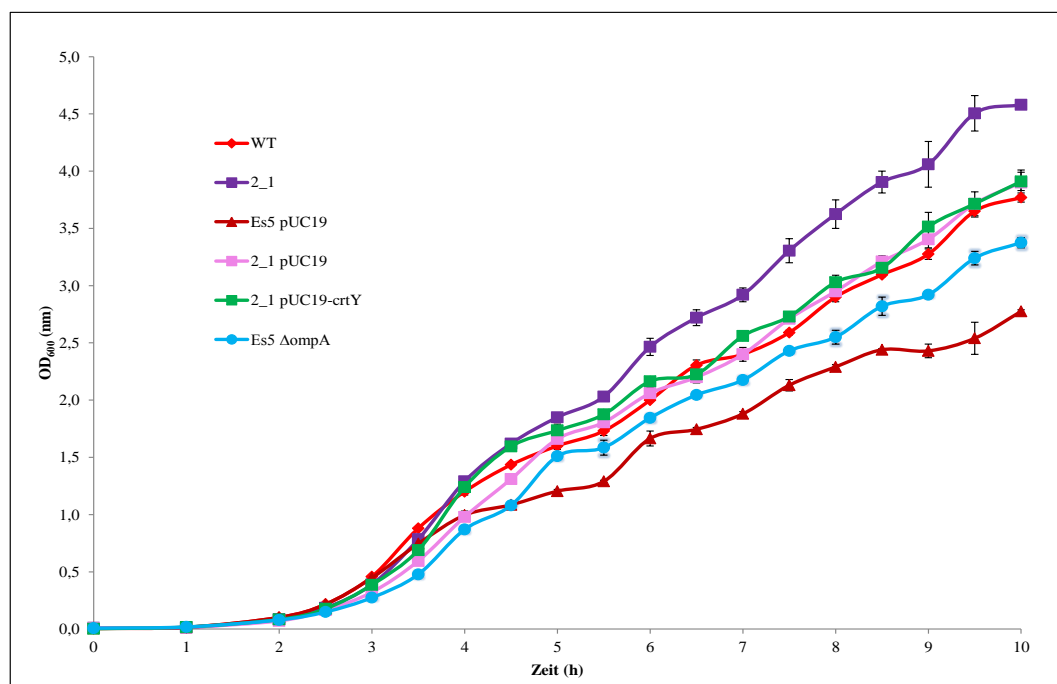


Abb. 11: Wachstum mit der komplementierten Mutante 2_1 und Kontrollstämmen sowie der Deletionsmutante ES5 Δ *ompA* (37°C, 10 h).

Da die Transposoninsertionsmutante 2_1 und ihre Komplementation mit pUC19-*crtY* hinsichtlich ihrer Pigmentbildung besonders interessant sind, wurde bei diesen Stämmen ausgewählt parallel zur Detektion des Wachstums mittels Messung der optischen Dichte auch der Bakterientiter in der Flüssigkultur bestimmt (Abb. 12). Die Lichtabsorption bei der photometrischen Messung ist nämlich nicht nur von der Dichte der Bakterienkultur abhängig, sondern auch von der Fähigkeit des Stammes Aggregate oder Pigmente zu bilden. Bei unterschiedlichen Stämmen kann also der Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und der entsprechenden CFU variieren. Der Vergleich von photometrisch bestimmten Wachstumskurven unterschiedlicher Stämme muss daher unter diesem Vorbehalt interpretiert werden.

In Abbildung 12 sind sowohl die stündlich erhobenen CFU-Werte des Wildtyps, der 2_1-Mutante und der komplementierten 2_1-Mutante in Form von Balken dargestellt, wie auch der Kurvenverlauf der Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Es ist deutlich erkennbar, dass die nach fünfstündiger Inkubation höhere optische Dichte des Stammes 2_1 nicht in Zusammenhang mit einem höheren Bakterientiter der Flüssigkultur steht, da die CFU-Werte im Vergleich zum Wildtyp nur minimal und nicht signifikant abweichen. Die Auswertung der CFU-Werte ergab für den Stamm 2_1 also ein wildtypisches Wachstum. Auf die Wachstumsanalyse der anderen 27 Transposoninsertionsmutanten übertragen bedeutet dies, dass Stämme mit einer im Vergleich zum Wildtyp höheren optischen Dichte als „mindestens wildtypisch wachsend“ angesehen werden müssen. Die höhere optische Dichte bei 600 nm wird hier durch Faktoren, die die Lichtabsorption beeinflussen, verursacht. Die Abweichung der Wachstumskurve der Mutante 2_1 im Vergleich zu der des Wildtyps und der der komplementierten Mutante kann durch den Unterschied in der Pigmentbildung erklärt werden. Es war keine Aggregatbildung erkennbar, allerdings sind die komplementierte Mutante und der Wildtyp zur Bildung von β -Carotin in der Lage, während diese Biosynthese bei 2_1-Mutante auf Stufe des Lycopins unterbrochen ist. Somit werden strukturell und farblich unterschiedliche Pigmente gebildet, deren Lichtabsorption ebenfalls variiert. Dies erklärt die höhere optische Dichte trotz des wildtypischen Bakterientiters bei der Mutante 2_1.

Die in den CFU-Werten erkennbare verlängerte lag-Phase der beiden Mutanten und die etwas niedrigeren Werte des komplementierten 2_1-Stammes können

durch den Einfluss der als Selektionsmarker zugegebenen Antibiotika Ampicillin bzw. Kanamycin erklärt werden.

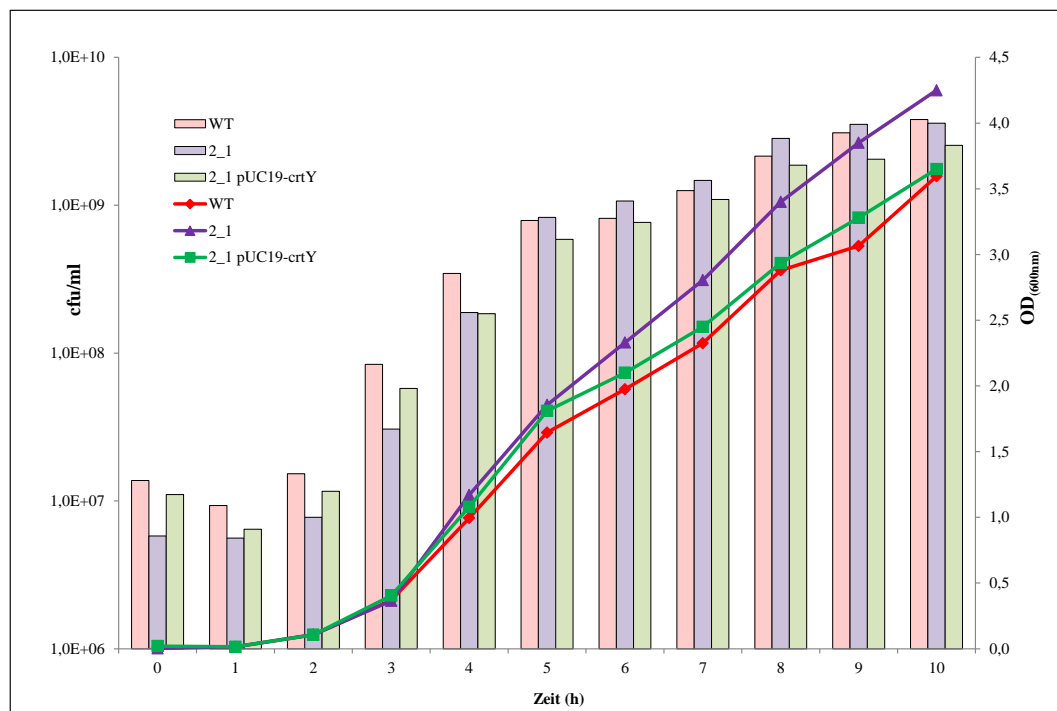


Abb. 12: Wachstum von *C. sakazakii* ES5, der Transposoninsertionsmutante 2_1 und der mit pUC19-*crtY* komplementierten Mutante 2_1; parallel detektiert über photometrische Messung und Bestimmung der CFU. Anzucht erfolgte in LB-Vollmedium bei 37°C, für 10 h, bei den Mutanten unter Zusatz von Ampicillin und Kanamycin. Die Messung wurde im Photometer bei OD₆₀₀ durchgeführt (Kurven); Für die CFU-Bestimmung wurden die entsprechenden Verdünnungsstufen auf LB-Agar, bei den Mutanten auf LB/Kan50- bzw. LB/Kan50/Amp150-Agar ausplattiert (Balken).

3.6. Phänotypische Analyse der *crtY*-Mutante im Zellkultursystem

Die im Rahmen dieser Arbeit komplementierte *C. sakazakii*-Mutante ES5*crtY*::Tn5/pUC19-*crtY* wurde gemeinsam mit den diesbezüglich relevanten Kontrollstämmen im Gentamycin-Assay auf Adhäsion, Invasion und intrazelluläre Proliferation im Zellkultursystem mit drei eukaryotischen Zelllinien untersucht. Als Referenzstämmen dienten der ES5 Wildtyp, die Transposoninsertionsmutante 2_1, also *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5, der Wildtyp ES5 mit dem pUC19-Leervektor (ES5/pUC19), sowie die Mutante 2_1 mit dem pUC19-Leervektor (2_1/pUC19). In allen Zelllinien war zu erkennen, dass der pUC19-Vektor sowohl im Wildtypstamm, wie auch in der Transposonmutante 2_1 zu geringen Abweichungen in der Adhäsion und Invasion sowie in der Proliferationsrate im Vergleich zu den Originalstämmen führt. Höhere CFU-Werte im Vergleich zum jeweiligen Kontrollstamm lassen sich durch die Tatsache erklären, dass es sich bei pUC19-Vektor um einen high-copy-Vektor handelt, während niedrigere CFU-

Werte durch das zugefügte Antibiotikum Ampicillin als Selektionsmarker verursacht werden können.

3.6.1. Caco-2-Zellen: Adhäsion, Invasion, intrazelluläre Proliferation

In den Caco-2-Darmepithelzellen war die Invasion der komplementierten Mutante 2_1/crtY⁺ mit 139% des Wildtyps im Gegensatz zu 83% des 2_1-Stamms deutlich erhöht (Abb. 13). Damit scheint *crtY* bzw. das vollständige gelbe Pigment eine Rolle bei der Invasion zu spielen. Die intrazelluläre Proliferation der komplementierten Mutante war im Vergleich zum Wildtyp erhöht und ähnelte dem Verhalten des 2_1-Stamms mit dem durch Transposoninsertion unterbrochenen *crtY*-Gen. Die höhere Vermehrungsrate könnte bei 2_1/crtY⁺-Stamm durch den high-copy-Vektor pUC19 verursacht sein.

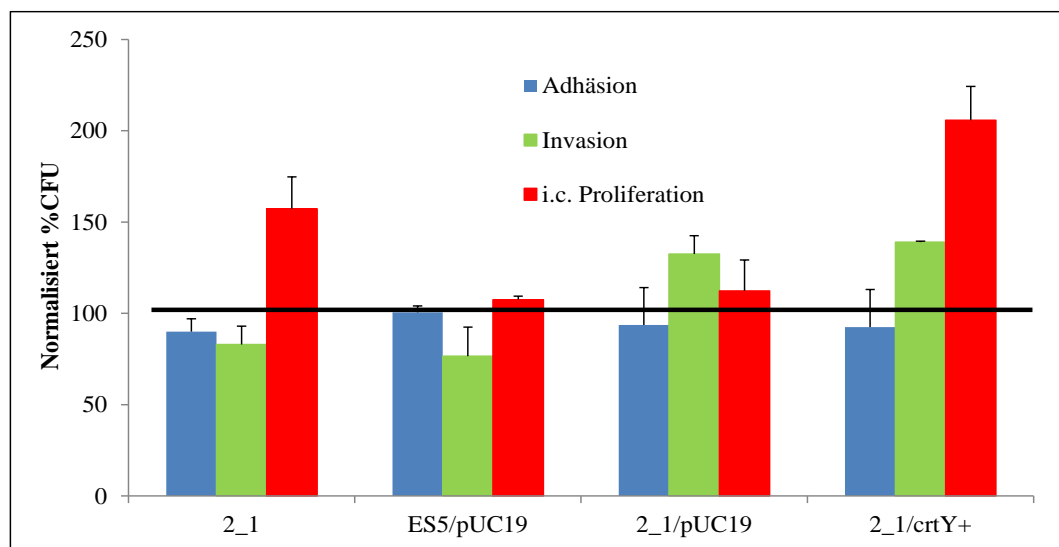


Abb. 13: Prozentuelle Darstellung der Adhäsion, Invasion und intrazellulären Proliferation der Transposonmutante 2_1, ES5/pUC19, 2_1/pUC19 und 2_1/pUC19-*crtY* im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in Caco-2-Zellen. Die schwarze Linie symbolisiert *C. sakazakii* ES5. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

3.6.2. RAW-264.7-Zellen: Adhäsion, Invasion, intrazelluläre Proliferation

In den RAW-264.7-Makrophagen fiel wie bei den anderen Pigmentmutanten das deutlich verminderte Adhäsions- und Invasionspotential auf (Abb.14). Auch beim Wildtyp mit dem Leervektor pUC19 waren Adhäsion- und Invasion mit 75% bzw. 80% deutlich reduziert, sowie bei der komplementierten *crtY*-Mutante mit nur 41,5% bzw. 43,5% des Wildtypwertes. Die intrazelluläre Proliferation war dagegen beim *C. sakazakii* ES5/pUC19 wildtypisch und auch das Ergebnis von *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5/pUC19-*crtY* entsprach dem Wildtyp, da die Diskrepanz des höheren Wertes auch beim Vergleich von 2_1- und 2_1/pUC19-Stämmen zu sehen war.

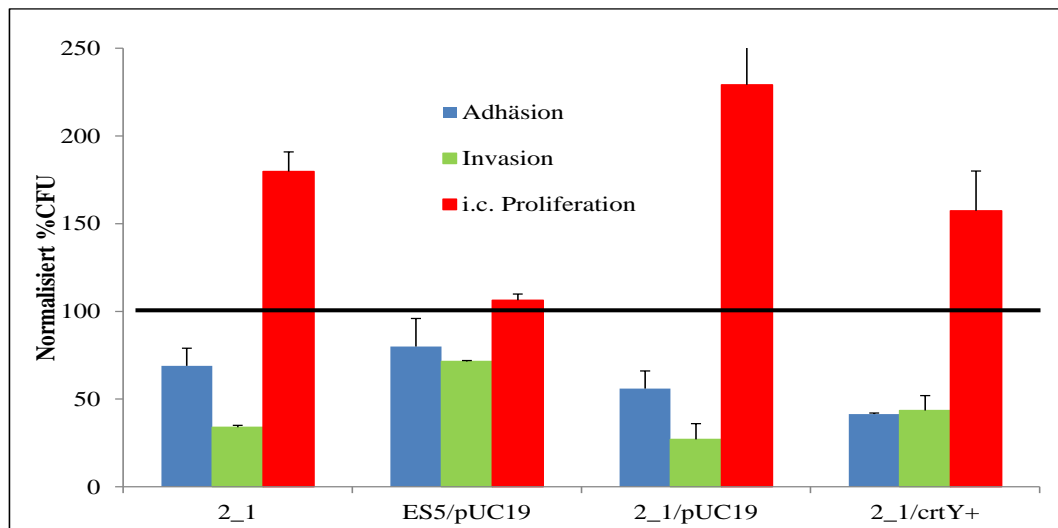


Abb. 14: Prozentuelle Darstellung der Adhäsion, Invasion und intrazellulären Proliferation der Transposonmutante 2_1, ES5/pUC19, 2_1/pUC19 und 2_1/pUC19-*crtY* im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in RAW-264.7-Zellen. Die schwarze Linie symbolisiert *C. sakazakii* ES5. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

3.6.3. HBMEC-Zellen: Adhäsion, Invasion, intrazelluläre Proliferation

Das Screening in den HBMEC-Zellen zeigte, dass die komplementierte *crtY*-Mutante sich bei Invasion und intrazellulärer Proliferation wildtypisch verhält (Abb. 15). Mit 122%iger Invasion und 158%iger intrazellulärer Proliferation waren die Werte zwar im Vergleich zum Wildtyp erhöht, die Mutante 2_1 erreichte aber mit 68% bzw. 58% nicht das Wildtyp-Level und war somit vermindert. Die Adhäsion von 2_1/*crtY*⁺ liegt mit 153% zwischen dem Wert der Transposoninsertionsmutante und dem Wildtyp. Damit scheint die Pigmentbildung die Invasion und die Persistenz in HBMEC-Zellen zu begünstigen.

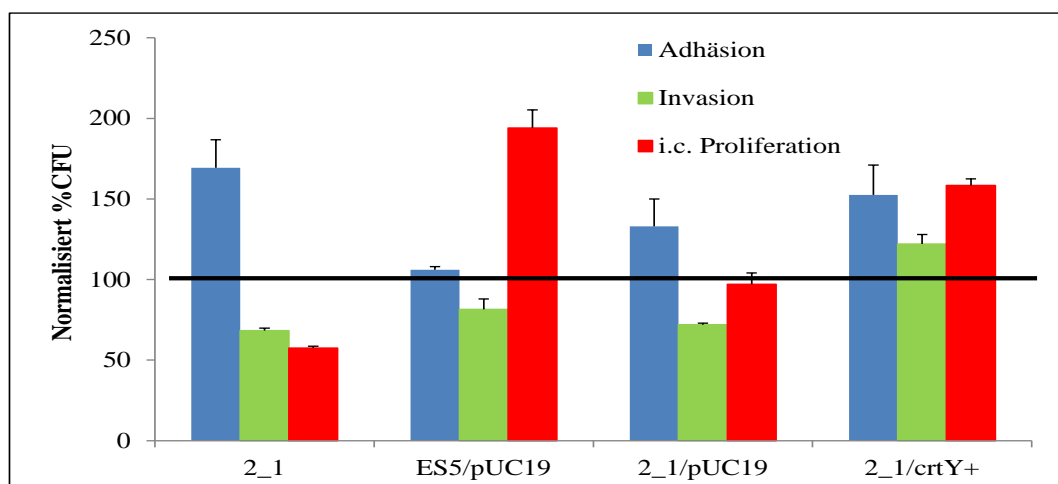


Abb. 15: Prozentuelle Darstellung der Adhäsion, Invasion und intrazellulären Proliferation der Transposonmutante 2_1, ES5/pUC19, 2_1/pUC19 und 2_1/pUC19-*crtY* im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in HBMEC-Zellen. Die schwarze Linie symbolisiert *C. sakazakii* ES5. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

4. *In vitro* Wachstumsanalyse der Transposon-insertionsmutanten

Um zu überprüfen, ob die Mutation die Proliferation der Transposoninsertionsmutanten unter optimalen Wachstumsbedingungen beeinflusst, wurden die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in LB-Medium bei 37°C aerob angezogen. LB ist ein nährstoffreiches Medium, das sich für die Kultivierung von *Enterobacteriaceae* gut eignet. Für die Analyse wurden die einzelnen Stämme in 50 ml Flüssigmedium mit der optischen Dichte von $OD_{600}=0,01$ aus einer üNK in 250 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm über zehn Stunden inkubiert. In diesem Zeitraum wurden in konstantem Abstand Proben entnommen und im Photometer die OD_{600} gemessen. Als Referenz diente das sterile LB-Flüssigmedium.

Die Analyse ergab eine Varianz bezüglich des *in vitro* Wachstums der einzelnen Stämme. Anhand des Wachstumsverhaltens konnten die Mutanten im Vergleich zum dem Wildtyp in folgende Gruppen eingeteilt werden: wildtypisches Wachstum, Wachstum mit verzögerter lag-Phase, Wachstum mit früherem Erreichen der stationären Phase, gesteigertes

Tab. 14: COG-Klassifizierung der einzelnen Mutanten sowie ihr Wachstumsverhalten in LB-Medium.

Mutante	ESA_Nr.	COG	Wachstum
BF2	ESA_01356	WM	wt
BF9	ESA_00861	EH	wt
BF15	ESA_00282	WM	wt*
BF14	ESA_00281	R	wt*
BF16	ESA_04207	GC	wt
BF1	ESA_02449	D	vermindert
BF4	ESA_04103	M	wt
BF5	ESA_01287	N	wt
BF8	ESA_02873	C	wt
BF12	ESA_04204	M	wt
BF13	ESA_02266	NUM	erhöht
BF17	ESA_pESA3p05536	P	erhöht
82_2	ESA_00345	CG	wt
39_1	ESA_00344	GH	erhöht
2_1	ESA_00344	GH	erhöht
76_1	ESA_00343	Q	wt
3_1	ESA_00342	I	erhöht
69_1	ESA_02622	CG	vermindert
31_1	ESA_02621	CG	vermindert
68_1	ESA_03220	CG	vermindert*
79_1	ESA_03622	CG	vermindert
38_1	ESA_00343	Q	erhöht
1_4	ESA_00345	GC	wt
89_1	ESA_03563	S	wt*
24_2	ESA_00347	H	erhöht
67_1	ESA_04343	R	wt
MTP 51_C4	ESA_03258	K	wt
MTP 51_C6	ESA_04029	K	wt

wt = wildtypisch, wt* = wildtypisch mit leicht verzögerter lag-Phase (1-4 h),
vermindert = früheres Erreichen der stationären Phase, vermindert* = stark vermindert
erhöht = höhere OD-Werte als beim Wildtyp

Wachstum und vermindertes Wachstum (Tab. 14; Abb. 11). Bei 27 Mutanten war das Wachstumsverhalten nicht oder nur in geringem Maße beeinträchtigt. Lediglich bei der Mutante 68_1 scheint die Mutation den Stoffwechsel so sehr zu beeinträchtigen, dass das Wachstum massiv vermindert ist. Auch auf LB-Festmedium wächst diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich langsamer

und bildet ganz kleine Einzelkolonien. Aus diesem Grund wurde 68_1 von Infektionsversuchen ausgeschlossen, da eine Beurteilung des Adhäsions- und Invasionspotentials sowie der intrazellulären Proliferationsfähigkeit aufgrund der allgemeinen Wachstumsdefizite nicht möglich wäre.

Die Stämme BF1, 69_1, 31_1 und 79_1, die früher als der Wildtyp die stationäre Phase erreichen, wurden in einem weiteren Versuch über die Dauer von 40 Stunden angezogen. Aufgrund ihrer Mutation konnten diese Transposoninsertionsmutanten das von Wildtyp ES5 besser verwertbare Substrat nicht optimal verstoffwechseln. Solange dieses Substrat vorhanden ist, können Enzyme zum Abbau alternativer Substanzen nicht synthetisiert werden. Deshalb werden erst nach Verbrauch des ersten Substrats alternative Quellen genutzt. Dies würde sich in einem zweiphasigen Wachstum (Diauxie) zeigen. Diauxie konnte für die getesteten Mutanten allerdings ausgeschlossen werden: Nach dem Eintritt in die stationäre Phase konnte auch über diesen längeren Zeitraum kein deutlicher Anstieg der optischen Dichte beobachtet werden.

Eine besondere Eigenschaft ließ sich bei BF1 beobachten: Der Stamm bildet in LB-Flüssigmedium voluminöse weißliche Aggregate, die sich auch durch Vortexen nicht auflösen lassen.

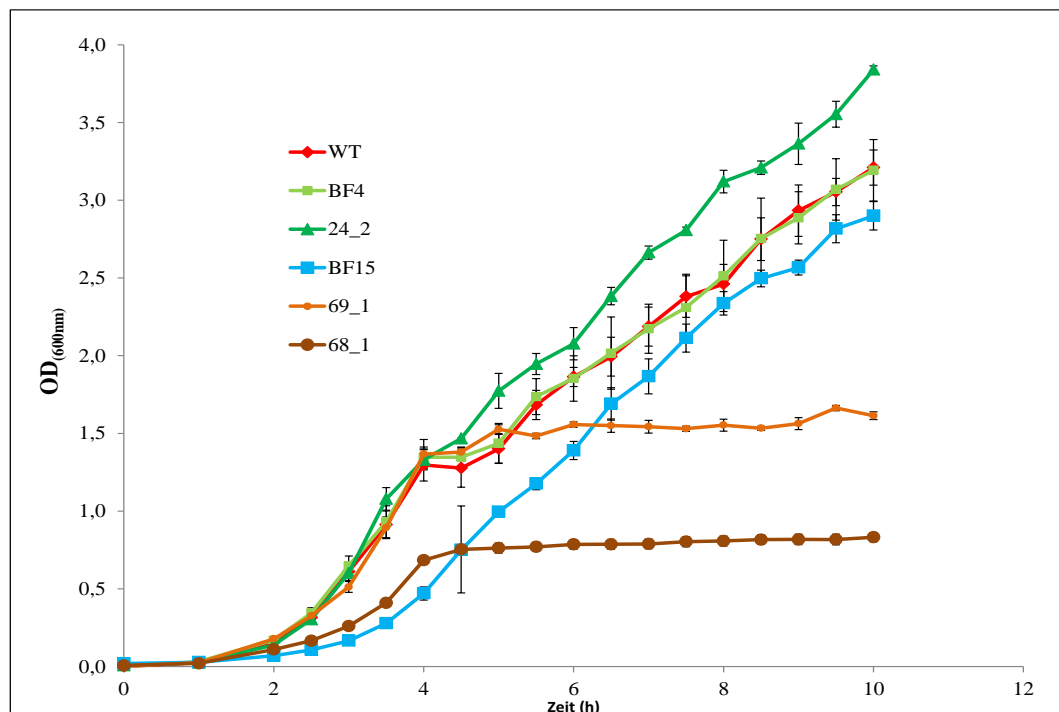


Abb. 16: Wachstum von *C. sakazakii* ES5 und fünf Insertionsmutanten als Beispiel für jedes beobachtete Wachstumsverhalten in LB-Vollmedium (37°C, 10 h). Die dargestellten Mittelwerte stammen aus dreifachen Ansätzen pro Stamm und aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

5. Untersuchung zur Pathogenität von *C. sakazakii* ES5-Transposonmutanten

Die Kolonisationsfähigkeit von Wirtszellen der in dieser Arbeit untersuchten *Cronobacter*-Mutanten wurde mit Hilfe des Gentamicinassays (*Gentamicin Protection Assay*) in unterschiedlichen Zelllinien analysiert.

Die Fähigkeit eines Bakteriums in Wirtszellen einzudringen, dort zu überleben und sich zu vermehren, ist ein entscheidender Pathogenitätsfaktor. Auch virulente *Cronobacter* spp.-Stämme sind zu Invasion und intrazellulärer Proliferation in der Lage. Mit Hilfe der Transposoninsertionsmutanten ist es möglich, zu untersuchen, welche Gene, bzw. welche Proteine, für die sie kodieren, für die Kolonisation von Bedeutung sind. Da das Oberflächenprotein OmpA bekanntermaßen einen Effekt auf die Adhäsion an und die Invasion in eukaryotische Zellen hat, wurde in dieser Studie eine *ompA*-Deletionsmutante als Kontrolle für Adhäsion und Invasion attenuiertes Verhalten mituntersucht.

Die Infektionsversuche wurden *in vitro* mit drei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt: Caco-2-Zellen (Darmepithel), RAW-264.7 (Makrophagen) und HBMEC (mikrovaskuläre Hirnendothelzellen). Das Vorgehen ist der Pathogenese von *C. sakazakii* im Menschen nachempfunden. Nach der oralen Infektion und der primären Lokalinfektion im Darm folgt eine systemische Infektion über die Invasion in Makrophagen und schließlich das Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke und die Infektion des Gehirns.

Die Infektion wurde mit Bakterien aus der *log*-Phase durchgeführt, da vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben, dass Bakterien aus dieser Wachstumsphase am invasivsten sind (K. Schauer, mündliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde die Übernachtskultur (17 h) zweiprozentig inokuliert und weitere zwei Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. In Vorversuchen wurde ermittelt, wie viele koloniebildende Einheiten (CFU) sich spezifisch für jeden Stamm nach dieser zweistündigen Inkubationszeit in der Kultur befinden. Mit Hilfe dieses CFU-Wertes konnte die MOI (*Multiplicity of Infection*) berechnet werden. Unter standardisierten Bedingungen wurden die eukaryotischen Zellen mit je einem Stamm der Transposoninsertionsmutanten infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten (Adhäsion, Invasion und Proliferation) lysiert, um die Bakterien zu reisolieren. Die Waschschrte mit Gentamicin-haltigem Medium ab 90 Minuten *post infection* töten noch extrazellulär verbliebene Bakterien ab. In

einem der Vorversuche wurde die bakterizide Wirkung von Gentamicin auf *C. sakazakii* ES5 überprüft: Für längere Inkubation über zwei Stunden sind 10 µg/ml an Gentamicin ausreichend, um extrazelluläre *C. sakazakii* abzutöten. Die eukaryotischen Zellen wurden dabei nicht beeinträchtigt. Die intrazellulären Bakterien wurden nach Lyse der eukaryotischen Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und nach der Bebrütung über Nacht die CFU bestimmt. Diese wird mit der Infektionslösung verrechnet und ins prozentuale Verhältnis zum Wildtyp (Positivkontrolle) gesetzt. 100% steht somit für die vom Wildtyp erreichten Adhäsions-, Invasions- und Proliferationswerte. Erreicht eine Mutante höhere oder niedrigere Werte, ist dies ein Indiz auf den Einfluss des defekten Gens auf die Kolonisationsfähigkeit der eukaryotischen Zellen durch *C. sakazakii* ES5.

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien werden einzeln betrachtet, da das Kolonisationsverhalten des Wildtyps *C. sakazakii* ES5 je nach Zelllinie variiert. Die CFU-Durchschnittswerte je Zelllinie und Zeitpunkt (Adhäsion, Invasion und Proliferation) von *C. sakazakii* ES5 aus allen durchgeführten Versuchen zeigten deutlich das spezifische Verhalten des Bakteriums in den unterschiedlichen eukaryotischen Zellen (Abb. 17). Dabei fällt auf, dass die Werte zum Zeitpunkt der Adhäsion in der RAW264.7-Zelllinie höher sind, als in den beiden anderen Zelllinien. Das lässt sich damit erklären, dass es sich bei den RAW-264.7-Zellen um Makrophagen handelt, die durch Phagozytose die Bakterien aktiv aufnehmen können. Nach dem Zeitpunkt der Invasion kommt es in keiner der drei Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der CFU. Dies deutet auf eine Persistenz des Bakteriums in seinen Wirtszellen hin.

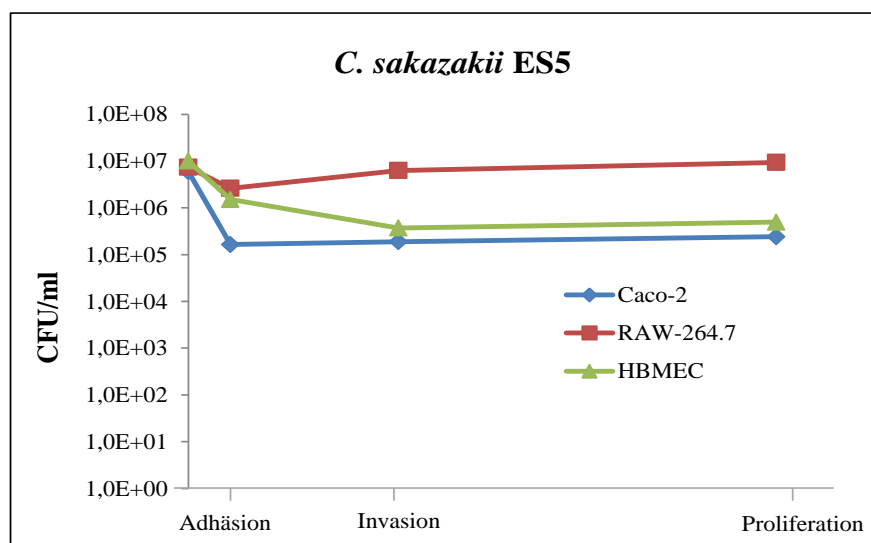


Abb. 17: Kolonisation der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien durch *C. sakazakii* ES5. Caco-2, humane epitheliale Dickdarmadenokarzinomzellen; RAW-264.7, murine Makrophagenzellen; HBMEC, humane, mikrovaskuläre Hirnendothelzellen.

5.1. Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit der Transposonmutanten bei Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen sind humane epitheliale Dickdarmadenokarzinom-Zellen, die an künstlichen Oberflächen adhären und häufig für Infektionsversuche genutzt werden. Der Darm ist in der Pathogenese von *C. sakazakii* als Ort der primären lokalen Infektion wichtig und wurde in dieser Arbeit durch die Caco-2-Zellen als *in vitro*-Modell symbolisiert.

Bei der Adhäsion an Caco-2-Zellen, die in Abbildung 18 dargestellt ist, waren insbesondere folgende Mutanten auffällig: Die beiden Mutanten, deren Flagellen brüchig und verkürzt (BF5) bzw. nicht mehr vorhanden sind (BF13), sowie BF4-Stamm, bei dem das Gen für die O-Antigen-Ligase inaktiviert ist. Die Adhäsion von BF4 war im Vergleich zum Wildtyp um 87% vermindert, die von BF5 um 86% und von BF13 um 85,5%. BF2-Stamm, eine Flagellenmutante mit elektronenmikroskopisch intakten Flagellen, adhärert dagegen wildtypisch. Um 70% oder mehr war die Adhäsion folgender Mutanten vermindert: 2_1, 76_1, 31_1, 79_1, 38_1 und 67_1. Der Vergleich mit der *ompA*-Deletionsmutante zeigt, dass bei diesen Stämmen der Effekt der Mutation auf die Adhäsion an Caco-2-Zellen vergleichbar oder im Fall von BF5 und BF13 sogar stärker ist, als das Fehlen des OmpA-Proteins.

Besonders gut dagegen adhärten die Stämme BF8 (142%) und BF17 (134%).

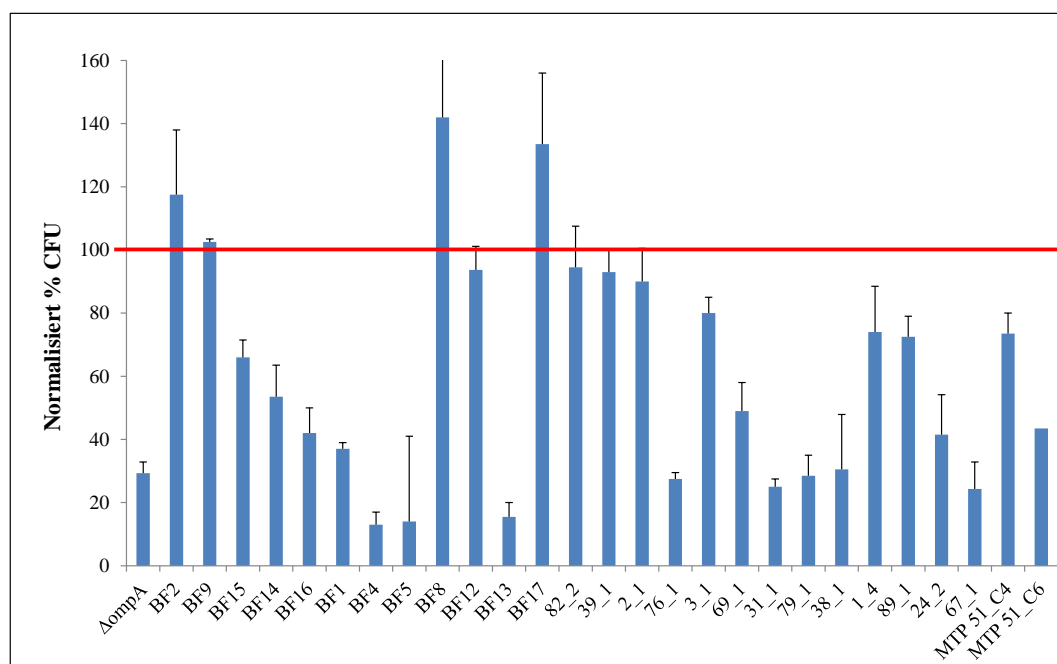


Abb. 18: Prozentuelle Darstellung des Adhäsionspotentials von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 an Caco-2-Zellen. Die rote Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *ompA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Bei der Überprüfung des Invasionsvermögens wird die Attenuation der beiden Flagellen-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp noch deutlicher (Abb.19): Die Invasion betrug lediglich 0,4% (BF5) bzw. 0,5% (BF13) des Wildtyps. Ebenfalls stark vermindert (um mehr als 70%) war die Invasion bei BF1 (13%), 31_1 (16%), 69_1 (25%), 67_1 (26,5%) und 89_1 (28%). Besonders invasiv waren dagegen die Mutanten BF2 (139,5%), BF9 (199,5%) und 82_2 (179,5%).

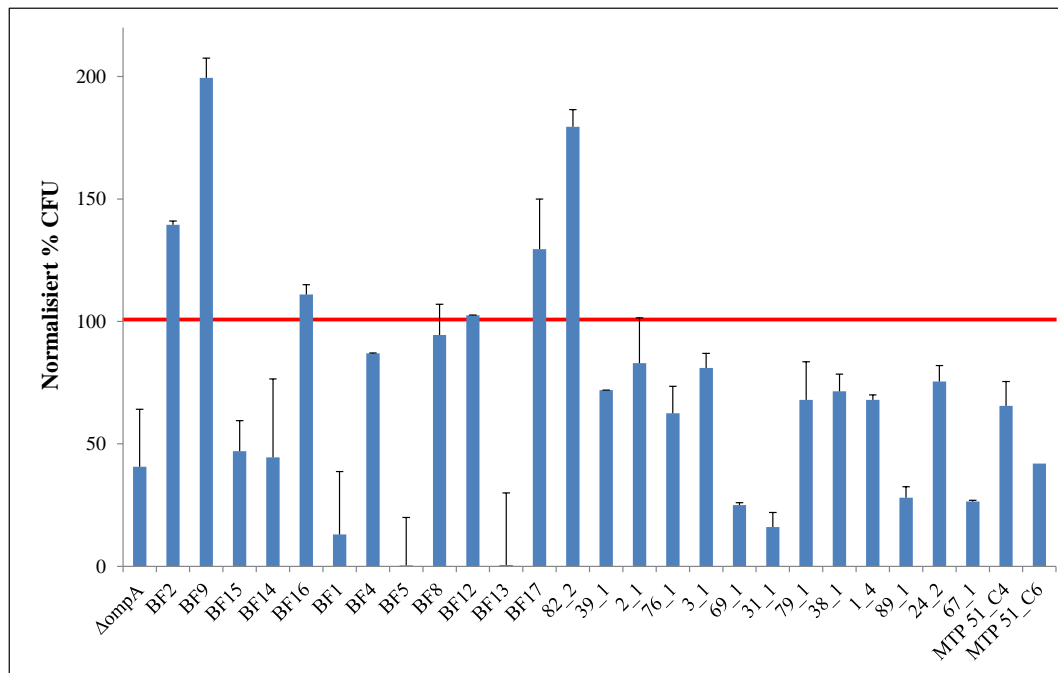


Abb. 19: Prozentuelle Darstellung des Invasionspotentials von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in Caco-2-Zellen. Die rote Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *ompA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die Lyse der eukaryotischen Zellen 7 h *post infection* ermöglicht eine Evaluierung des intrazellulären Proliferationsvermögens der Bakterien. Um die CFU-Werte diesbezüglich interpretieren zu können, müssen sie ins Verhältnis zu den CFU-Werten zum Zeitpunkt der Invasion gesetzt werden, also die Proliferationsrate bestimmt werden (Abb. 20). Die Aussagekraft des tatsächlichen CFU-Wertes/Well nach sieben Stunden ist deshalb unzureichend, da dieser natürlich in hohem Maße davon abhängig ist, wie viele Bakterien überhaupt in der Lage waren, in die eukaryotische Zelle einzudringen. Erst die Analyse, wie viele Bakterien direkt nach der Invasionsphase in der Wirtszelle sind (Invasionswert) und wie sich eben diese Anzahl über z.B. fünf Stunden verändert (Proliferationsrate), kann eine Aussage über die intrazelluläre Persistenz bzw. Proliferation getroffen werden. Die Notwendigkeit zur Bestimmung dieser Rate wird vor allem bei den attenuierten Transposoninsertionsmutanten sowie der

ompA-Deletionsmutante deutlich. Im Gegensatz zum Adhäsions- und Invasionsvermögen zeigte sich nämlich, dass die Proliferationsrate in der Wirtszelle im Vergleich zum Wildtyp nur wenig oder gar nicht durch die Mutation beeinflusst wurde oder wie bei den Stämmen BF5 und BF13 sogar erhöht ist.

Zwei Drittel der untersuchten Mutanten wiesen im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Proliferationsraten auf. Die Stämme BF4 und BF8 verhielten sich wildtypisch und lediglich 82_2, BF17, BF12, BF5, BF1, BF9 und BF2 waren um 35 – 60% im Vergleich zum Wildtyp in ihrer intrazellulären Proliferation in Caco-2-Zellen vermindert.

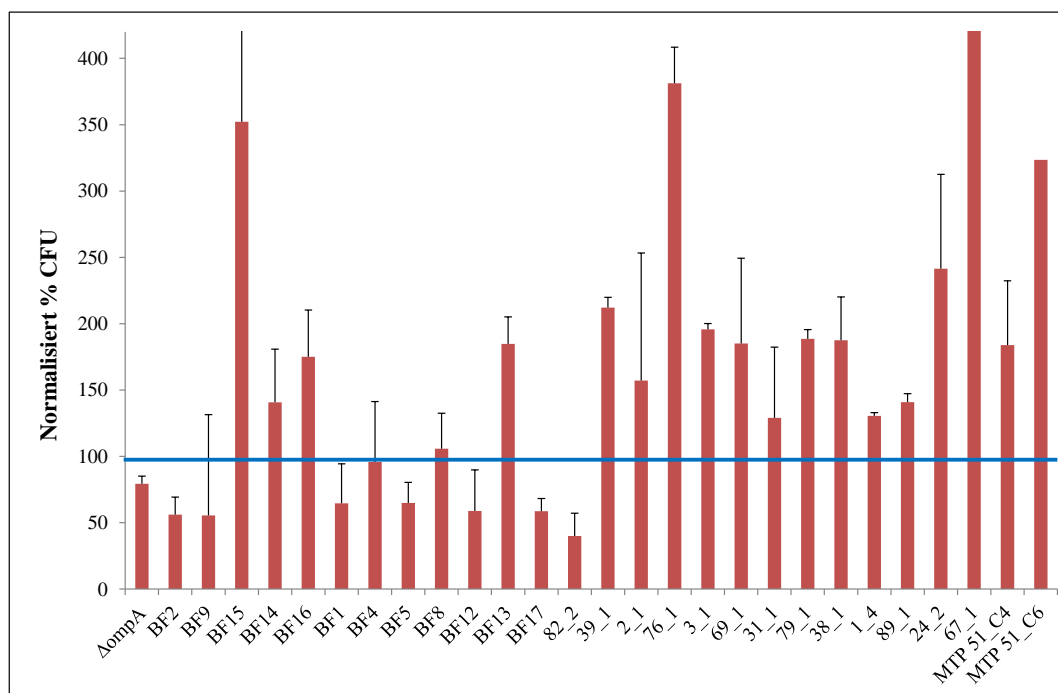


Abb. 20: Prozentuelle Darstellung der intrazellulären Proliferation von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in Caco-2-Zellen. Die blaue Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

5.2. Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit der Transposonmutanten in RAW-264.7-Zellen

RAW-264.7-Zellen sind murine Makrophagen, die als besonderes Merkmal an Oberflächen adhären und die sich durch diese Monolayer-Bildung besonders für *in vitro* Infektionsversuche eignen. In der Pathogenese von *Cronobacter sakazakii* nehmen Makrophagen eine wichtige Stellung bezüglich der systemischen Infektion ein. *C. sakazakii* kann intrazellulär in den Makrophagen

überleben und nutzt sie, um sich im ganzen Körper auszubreiten und diverse Organe zu befallen.

Im Gegensatz zu den beiden anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, Caco-2 und HBMEC, nehmen die RAW-264.7-Zellen als Makrophagen Bakterien, in diesem Fall *C. sakazakii* ES5, aktiv auf. Außerdem sind sie mit ihren phagozytären Zell-Organellen speziell dafür ausgerüstet, Fremdanigen zu lysieren.

Beim Screening der Transposonmutanten in RAW-264.7-Zellen fiel besonders die geringe Adhäsion aller farblosen Mutanten auf (Abb. 21). Keine der Pigment-Mutanten erreichte 50% des Wildtyp-Wertes. Die Adhäsion der Stämme 31_1 (7,5%) und 89_1 (9%) war sogar um mehr als 90% vermindert. Um weniger als 70% vermindert waren lediglich die der Stämme 39_1 (39,5%), 2_1 und 3_1 (beide 31,5%), 38_1 (39%) und 24_2 (35,5%). Auch die beiden Serum-Mutanten MTP 51_C4 und MTP 51_C6 adhärten nur mit 18% bzw. 25% des Wildtyps.

Bei den Biofilmmutanten verhalten sich die Stämme BF16, BF4 und BF12 wildtypisch, die Adhäsion von BF2, BF8 und BF9 war um weniger als 40% vermindert. Die Adhäsion der Flagellenmutanten BF5 und BF13 ist auch in den RAW-264.7-Zellen mit 2,5% bzw. 4% stark reduziert.

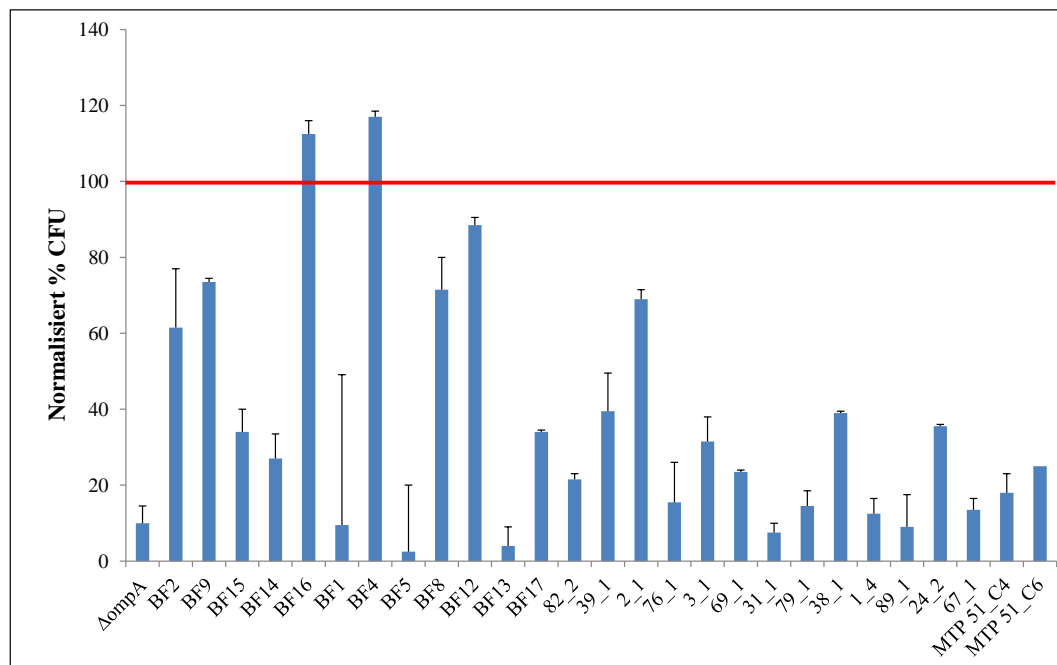


Abb. 21: Prozentuelle Darstellung des Adhäsionspotentials von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 an RAW-264.7-Zellen. Die rote Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die untersuchten Pigmentmutanten waren nicht nur in der Adhäsion reduziert, sie waren auch deutlich weniger invasiv als der Wildtyp (Abb. 22). Keine der

farblosen Mutanten erreichte auch nur die Hälfte des Wildtyp-Wertes. Die 38_1-Mutante war mit 45% des Wildtyp-Wertes die invasivste Pigmentmutante. Am wenigsten invasiv und um mehr als 90% vermindert waren 69_1 (7,5%), 31_1 (2,3%) und 89_1 (5,5%). Es fiel auf, dass sie sogar weniger effektiv in die RAW-264.7-Zellen eindringen, als die attenuierte *ompA*-Deletionsmutante.

Die Serummutanten zeigten ebenfalls starke Defizienz in der Invasion: MTP 51_C4 war um 77% und MTP 51_C6 um 86,5% vermindert.

Bei den Biofilm-Mutanten verhielten sich BF9, BF16, BF4 und BF8 wildtypisch, BF2 (86,5%), BF15 (52%), BF12 (68%) und BF17 (62,5%) waren mindestens halb so invasiv wie der Wildtyp. Die Invasionsfähigkeit der aflagellaten Mutante BF13 war auch in den RAW264.7-Zellen stark attenuiert (0,8%). Der BF5-Stamm mit den kurzen, brüchigen Flagellen, war dagegen mit 22,5% im Vergleich zum Wildtyp deutlich invasiver als in Caco-2-Zellen. Der BF1-Stamm wiederum schien mit 3,5% weniger gut in der Lage zu sein, die RAW-264.7 zu kolonisieren, als Caco-2-Zellen.

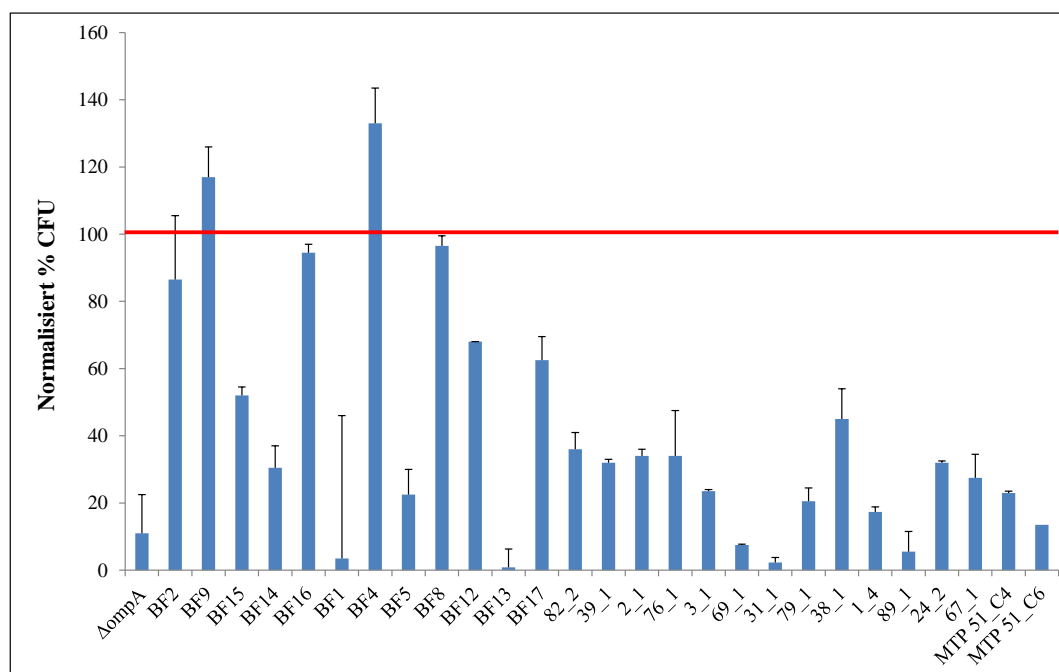


Abb. 22: Prozentuelle Darstellung des Invasionspotentials von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in RAW-264.7-Zellen. Die rote Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die intrazelluläre Proliferationsrate als Wert für die Persistenz bzw. die Proliferation in den RAW-264.7-Zellen nach sieben Stunden *post infection* weicht von dem Bild der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit ab (Abb. 23): Bei allen Pigmentmutanten sowie bei den beiden Serummutanten waren höhere Titer in den

eukaryotischen Zellen nachzuweisen, als beim Wildtyp (100%). Bei den Biofilmmutanten war lediglich der Stamm BF4 mit 73,5% im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Die Stämme BF1, BF12, BF14 und BF5 erreichten wie die Pigmentmutanten Proliferationsraten über 100%, alle anderen untersuchten Biofilmmutanten verhielten sich wildtypsich.

Alle hier gescreenten Mutanten waren also fähig in den RAW-264.7-Zellen zu persistieren und sogar zum Teil zu proliferieren. Sie scheinen damit in der Lage zu sein, der Lyse durch die Makrophagenzellen zu entgehen.

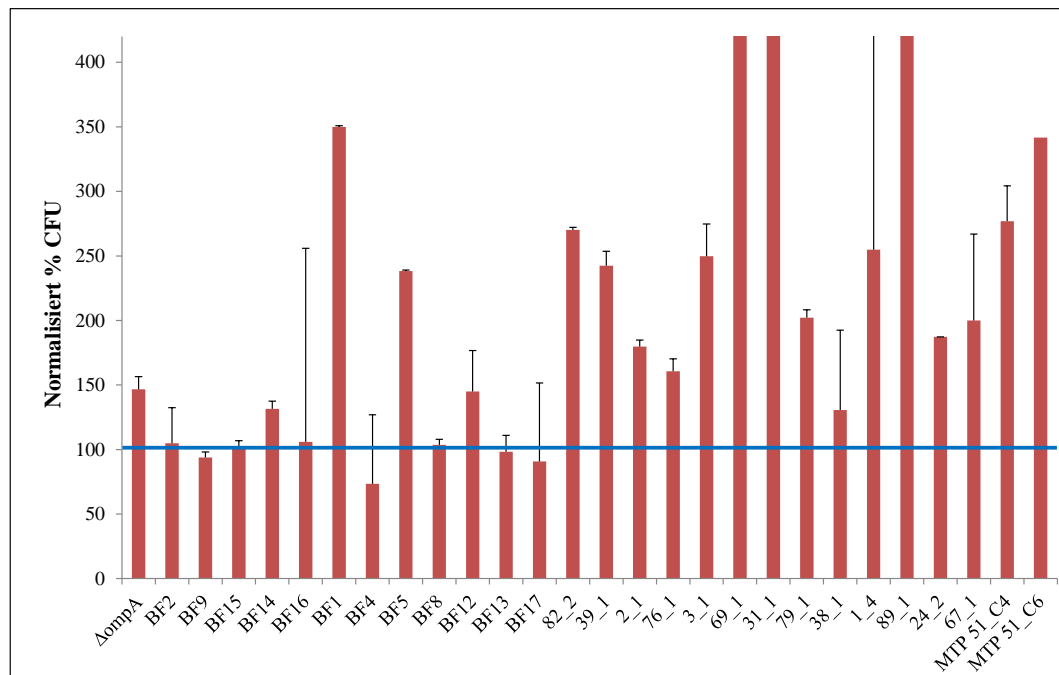


Abb. 23: Prozentuelle Darstellung der intrazellulären Proliferation von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in RAW-264.7-Zellen. Die blaue Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

5.3. Untersuchung der Kolonisationsfähigkeit der Transposonmutanten in HBMEC-Zellen

HBMEC-Zellen sind humane, mikrovaskuläre Hirnendothelzellen und dienen bei *in vitro* Versuchen zur Simulation der Bluthirnschranke. Da *Cronobacter sakazakii* ZNS-gängig ist und durch die von ihm hervorgerufene massive Schädigung im Gehirn klinisch zu Meningitis und geistiger Behinderung führt, ist die Bluthirnschranke nach der Darmbarriere und der Sepsisfähigkeit der dritte Punkt, der in der Pathogenese von besonderer Bedeutung ist.

In der Adhäsion an HBMEC-Zellen waren die Stämme BF2, BF8, BF12, BF17, 39_1, 3_1, 1_4 und MTP 51_C4 wildtypisch (Abb. 24). Zwei Pigmentmutanten,

2_1 mit 178,5% und 69_1 mit 140,5%, zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich höhere Adhäsion an die HBMEC-Zellen. Bei der Mutante 69_1 wich diese stark vom Adhäsionsverhalten an Caco-2- und RAW-264.7-Zellen ab. Die Flagellenmutanten BF5 und BF13 waren dagegen auch bei den Hirnendothelzellen nur in geringem Ausmaß in der Lage zu adhäreren (12,5% und 6,8%). Ebenso blieb die Serummutante MTP 51_C6 mit 12% weit hinter der Adhäsionsfähigkeit des Wildtyps zurück. Weitere Mutante zeigten ein um mehr als 50% im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Adhäsionspotential: BF9, BF15, BF14, BF16, 31_1, 79_1, 38_1, 24_2, 67_1.

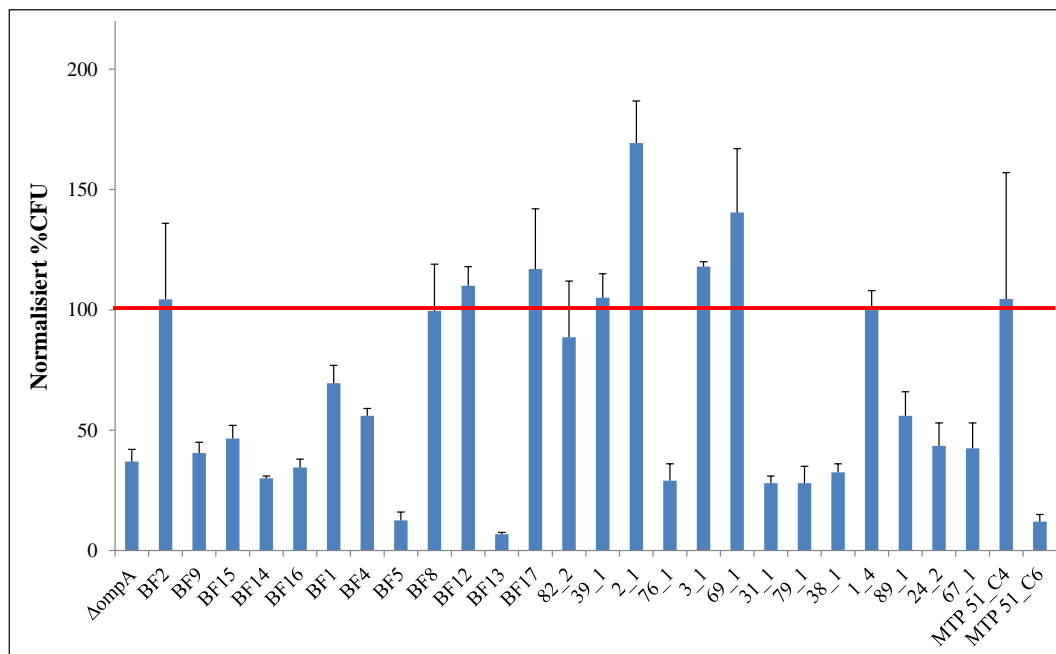


Abb. 24: Prozentuelle Darstellung des Adhäsionspotentials von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 an HBMEC-Zellen. Die rote Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Auffällig bei den Invasionswerten der Mutanten war, dass bei den Stämmen BF9, BF15, BF14 und BF16 trotz des schlechten Adhäsionsvermögens die Invasion wildtypisch oder im Vergleich zum Wildtyp sogar erhöht war (Abb. 25). Die Mutanten 2_1 und 69_1 erreichten im Gegensatz dazu trotz ihrer guten Adhäsion nur Invasionswerte von 68% bzw. 27% des Wildtyps.

Die Flagellenmutanten BF5 und BF13 waren attenuiert: im Vergleich zum Wildtyp war ihre Invasion um fast 100% reduziert und damit deutlich niedriger als die Invasionsfähigkeit der als Kontrolle dienende *ompA*-Deletionsmutante. Auch die Mutanten BF1 (2%), 31_1 (4%) und 89_1 (8,5%) waren kaum dazu in der Lage, in die HBMEC-Zellen einzudringen.

Am höchsten war der Invasionswert bei BF15 und BF17. Mit 171,5% bzw. 137% waren sie deutlich invasiver als der Wildtyp. Die Mutanten BF8 und BF12 verhielten sich wie auch schon in der Adhäsion wildtypisch.

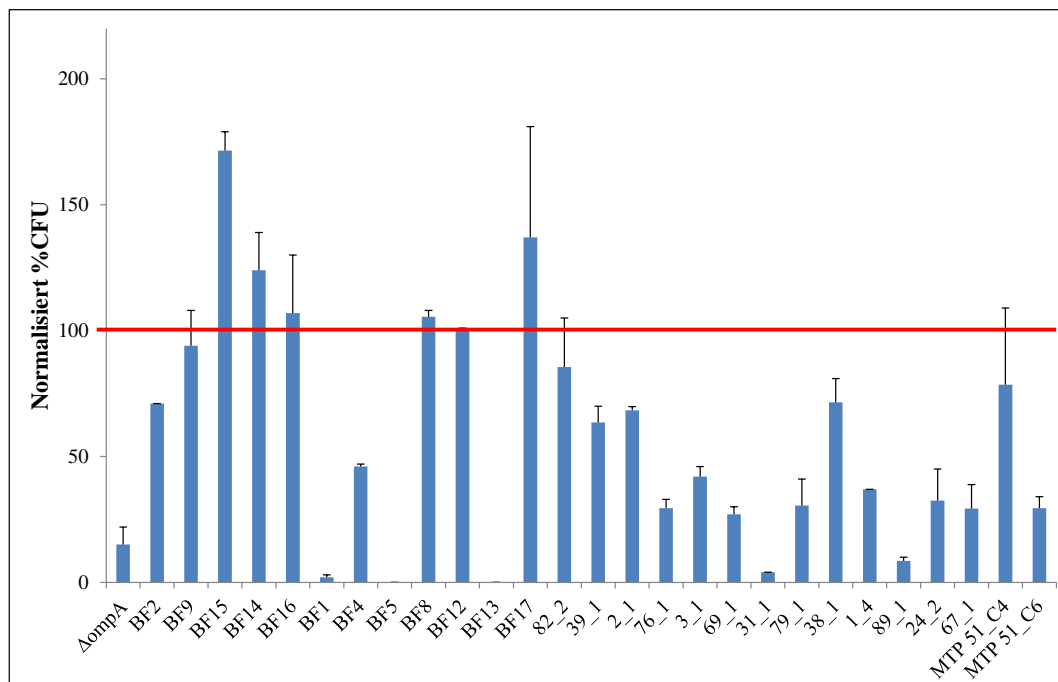


Abb. 25: Prozentuelle Darstellung des Invasionspotentials von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in HBMEC-Zellen. Die rote Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Bei der Berechnung der intrazellulären Proliferationsrate zur Überprüfung der Persistenz bzw. Proliferation in den HBMEC-Zellen 7 h *post infection* fiel auf, dass im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien doch einige Mutanten schlechtere Proliferation aufwiesen als der Wildtyp (Abb. 26). Dazu zählten die Stämme BF2, BF9, BF14, BF16, BF1, BF4, 2_1, 69_1, 31_1 und 38_1. Um sogar 50% oder mehr im Vergleich zum Wildtyp vermindert war die Proliferationsrate bei BF2 (50%), BF4 (23,9%) und 69_1 (44,2%). Erhöht ist die Proliferationsrate im Vergleich zum Wildtyp dagegen bei allen anderen Mutanten (BF12, BF13, 82_2, 39_1, 76_1, 3_1, 79_1, 1_4, 89_1 und 24_2).

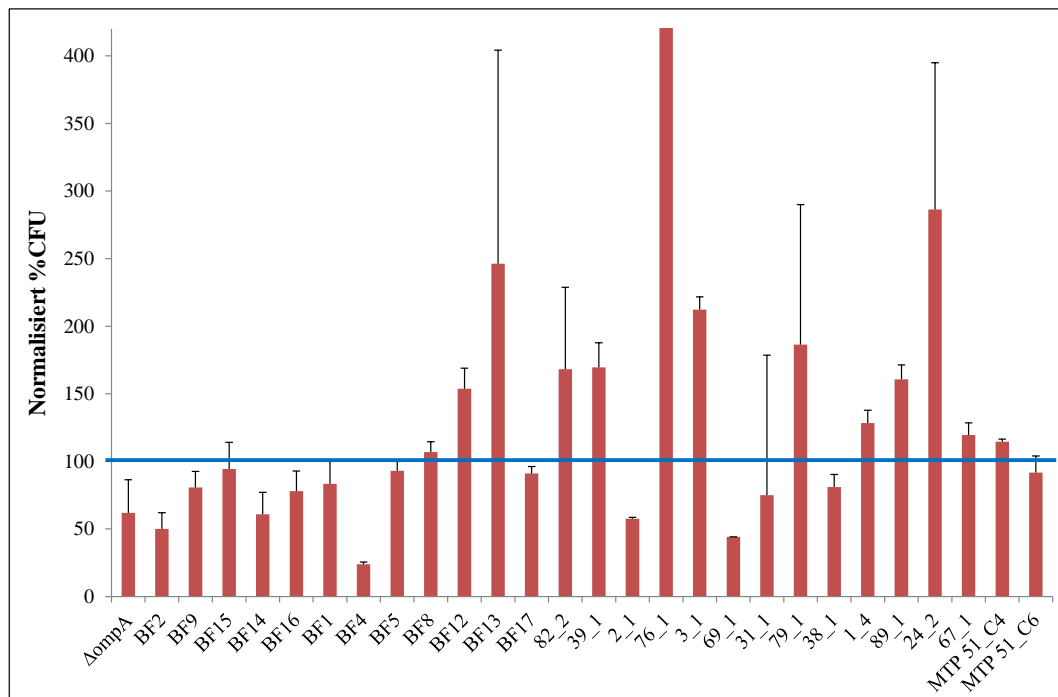


Abb. 26: Prozentuelle Darstellung der intrazellulären Proliferation von Transposonmutanten im Vergleich zu *C. sakazakii* ES5 in HBMEC-Zellen. Die blaue Linie symbolisiert den Wildtypstamm. Die *OmpA*-Deletionsmutante dient als Positivkontrolle für Adhäsionsdefizienz. Die Daten stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man die Ergebnisse aller drei Zelllinien, fallen zwei Mutanten besonders auf: Die beiden Flagellen-Mutanten BF5 (kurze, brüchige Flagellen) und BF13 (aflagellat) sind kaum in der Lage, an die hier untersuchten eukaryotischen Zellen zu adhären und sind in der Invasion attenuiert. Ihre Adhäsions- und Invasionswerte waren dabei deutlich niedriger, als die der *ompA*-Deletionsmutante, die als Referenz für Adhäsions- und Invasionsdefizienz mituntersucht wurde.

Auch die Mutanten 31_1, 89_1 und BF1 zeigten eine stark verminderte Invasion in allen drei Zelllinien. Diese drei Mutanten zeigten auch im Wachstum ein nicht-wildtypisches Verhalten. Bei den Mutanten BF1 und 31_1 betrifft die Mutation die Zellteilung bzw. die Energiegewinnung, also essentielle Mechanismen des bakteriellen Stoffwechsels. Bei der Mutante 89_1 codiert das unterbrochene Gen ESA_03563 für ein hypothetisches Protein, das eine Rolle in der Reifung der 30S-ribosomalen Untereinheit spielt.

Die O-Antigen-Ligase-Mutante BF4 war zwar bei der intrazellulären Proliferationsrate in Caco-2-Zellen fast wildtypisch, in RAW-264.7-Zellen war sie

aber die einzige Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp kaum persistiert bzw. proliferiert, trotz gutem Adhäsions- und Invasionsvermögens. Auch in den HBMEC-Zellen war die geringe Proliferationsrate auffällig.

Die Stämme BF8 und BF12 sind die beiden Mutanten, die sich, wenn man alle Zelllinien zu jedem Zeitpunkt betrachtet, am ehesten wildtypischen verhalten. Die Mutation beim BF12-Stamm betrifft die Cellulose-Synthase, beim BF8 das Cytochrom-O-Ubiquinol-Oxidase Protein C.

Die beiden Serummutanten 51_C4 und 51_C6 sind ebenfalls auffällig, vor allem in der RAW-264.7-Zelllinie.

Als Positivkontrolle diente in der Studie die Deletionmutante ES5 Δ ompA. Für das Oberflächenprotein OmpA ist der Einfluss auf die Adhäsion und Invasion von *Cronobacter sakazakii* an eukaryotische Zellen bekannt. Neben anderen, mehr oder weniger gut identifizierten und charakterisierten Virulenzfaktoren, spielt OmpA eine Rolle in der Fähigkeit von *C. sakazakii* in Wirtszellen einzudringen. In allen drei hier untersuchten Zelllinien bestätigte sich dies in der verminderten Adhäsions- und Invasionfähigkeit der ompA-Deletionsmutante. Im Vergleich mit den Transposoninsertionsmutanten fiel auf, dass insbesondere die Inaktivierung von Genen, die für die Flagellen-Funktion codieren (bei den Stämmen BF5 und BF13), einen noch größeren Effekt auf die Kolonisationsfähigkeit und somit die Virulenz von *C. sakazakii* hat.

6. Physiologische und biochemische Analyse der Flagellen bei *C. sakazakii* ES5

6.1. Überprüfung der Motilität von *C. sakazakii* ES5 und Flagellen-Mutanten

Der Zusammenhang zwischen Virulenz und der Fähigkeit eines Bakteriums zur Motilität ist bereits bekannt und weit verbreitet. Da in dieser Arbeit unter anderem Transposoninsertionsmutanten untersucht wurden, bei denen die Transposoninsertion in Bereichen des Genoms stattfand, die für die Flagellensynthese und -regulation codieren, war es von besonderem Interesse zu überprüfen, inwiefern diese Mutanten in ihrer Motilität eingeschränkt sind und ob dies auch im Zusammenhang mit einem geringeren Invasionspotential steht. Hartmann *et. al.* konnten bereits mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen die individuelle Flagellenausstattung bei diesen Mutanten zeigen: Bei der BF2-Mutante betrifft die Mutation das Flagellen-Protein Flh E, wirkt sich jedoch nicht morphologisch auf die Flagellen aus. Die Flagellen sind wildtypisch peritrich ausgebildet. Dagegen ist bei der BF5-Mutante die Synthese des Flagellenkappen-Proteins FliD betroffen, wodurch die Flagellen kürzer und brüchig sind. Bei BF13 betrifft die Mutation das Flagellenprotein Flg J, das unter anderem bei *Salmonella* und *E. coli* essentiell für den Aufbau des Flagellums ist. Das Fehlen des Proteins führt bei der BF13-Mutante zum aflagellaten Phänotyp (Hartmann et al., 2010).

Zwar war in Flüssigmedium lichtmikroskopisch die Motilität von *C. sakazakii* ES5 zu sehen, die flagellenvermittelte Fortbewegung wird aber beim Kontakt mit festem Untergrund eingestellt. Daher zeigt der ES5-Stamm in den Motilitätsassays im Gegensatz zu anderen *C. sakazakii* Stämmen und *C. turicensis* keine Motilität (Hartmann et al., 2010).

Die Motilität setzt sich zusammen aus Swimming und Swarming. Swimming ist die aktive Fortbewegung der einzelnen Bakterien mit Hilfe von Flagellen und Pili in Flüssigkultur und kann im 0,3%igen Weichagar detektiert werden.

Swarming bezeichnet die gemeinsame Ausbreitung der Bakterien auf der Oberfläche (0,6%iger Agar). In dieser Arbeit wurden zwei wildtypisch begeißelte Transposoninsertionsmutanten, nämlich die Mutanten BF2 und BF4 (Mutation im Gen für die O-Antigen-Ligase) sowie die beiden Mutanten BF5 und BF13 mit abweichender Flagellenstruktur sowohl auf Swarming als auch auf Swimming gescreent.

Alle vier getesteten Transposoninsertionsmutanten sowie der Wildtyp waren in der Lage, sich auf der Oberfläche von 0,6%igem LB-Agar über Swarming auszubreiten (Abb. 27). Nach 24- bis 48- stündiger Inkubation erreichten die Stämme einen Ausbreitungsdurchmesser zwischen 1,0 und 1,5 cm. Die Stämme BF5 und BF13 wiesen dabei das geringste Swarming-Potential auf.

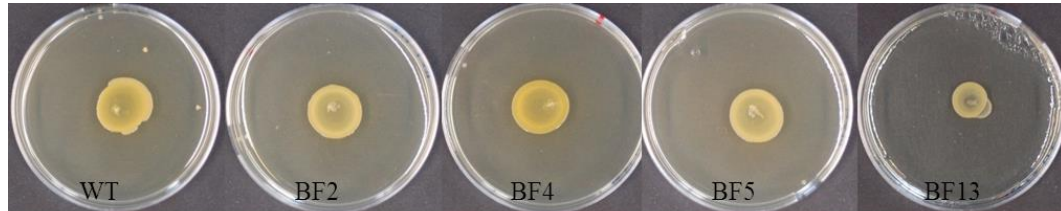


Abb. 27: Swarming von *C. sakazakii* ES5 und Transposoninsertionsmutanten auf 0,6%-LB-Agar nach 48 h Inkubation bei 37°C.

Bei der Überprüfung der Stämme auf die Fähigkeit zum Swimming, d.h. der Fortbewegung im Weichagar (0,3%), die maßgeblich durch die Flagellen ermöglicht wird, wichen die Ergebnisse der dreifachen Ansätze stark voneinander ab. Diese Varianz zeigte sich auch bei weiteren Wiederholungen des Versuchs.

Der Versuch wurde zunächst parallel in runden Petrischalen durchgeführt, die jeweils nur mit einem Stamm inokuliert wurden, und in quadratischen Petrischalen, auf denen in regelmäßigem Abstand neun Stämme angeimpft wurden. Während sich in den runden Petrischalen die in der Literatur beschriebene Amotilität bestätigte, zeigte vor allem die BF2-Mutante in Kombination mit dem Wildtyp auf einer Platte nach Inkubation über 12 Stunden deutliches Swimming (Abb. 28).

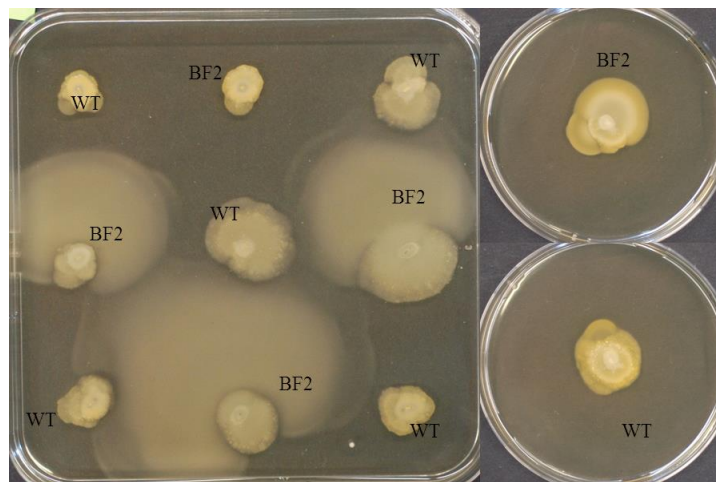


Abb. 28: Wildtyp und BF2 im 0,3%igen LB-Weichagar in quadratischen und runden Petrischalen nach 48 h Inkubation bei 37°C.

Die Mehrfache Wiederholung des Versuchs ergab, dass vereinzelt sich auch in den runden Petrischalen beim Wildtyp oder den Mutanten mit intakten Flagellen nach mehr als 12-stündiger Inkubation eine unregelmäßige Swimming-Zone zeigte, in den allermeisten Fällen war hier aber nur Swarming zu beobachten. In den quadratischen Petrischalen jedoch, in denen an neun Stellen angeimpft wurde, zeigte BF2, aber auch BF4 und teils auch BF5, Motilität durch Swimming.

Im nächsten Schritt wurde der Versuch modifiziert. Zum einen wurde 0,02% Tween80 als Detergenz zur Minderung der Oberflächenspannung dem Medium vor Gießen der 0,3%-Agar-Platten zugegeben und zum anderen wurde der Überstand einer *C. sakazakii* ES5-Kultur bei einer bestimmten optischen Dichte ($OD_{600} = 600 \text{ nm}$) geerntet, steril filtriert und dem autoklavierten Agar nach dem Abkühlen auf 60°C zugegeben. Die Endkonzentration des Agars betrug auch hier 0,3%. In Vorversuchen wurde ermittelt, bei welcher optischen Dichte der *C. sakazakii* ES5-Kultur sich der Überstand auf das Swimming der BF2-Mutante am deutlichsten auswirkt (s. Abb. 29A). Der Überstand wurde bei $OD_{600} = 0,5 / 0,6 / 0,8 / 1,0$ geerntet und getestet. Da bei den Weichagarplatten mit Zusatz des Überstands der $OD_{600} = 0,6$ der Durchmesser der Motilitätszone von BF2 am größten war, wurde in allen folgenden Motilityassays mit Zusatz von Überstand einer ES5-Kultur der $OD_{600} = 0,6$ gearbeitet.

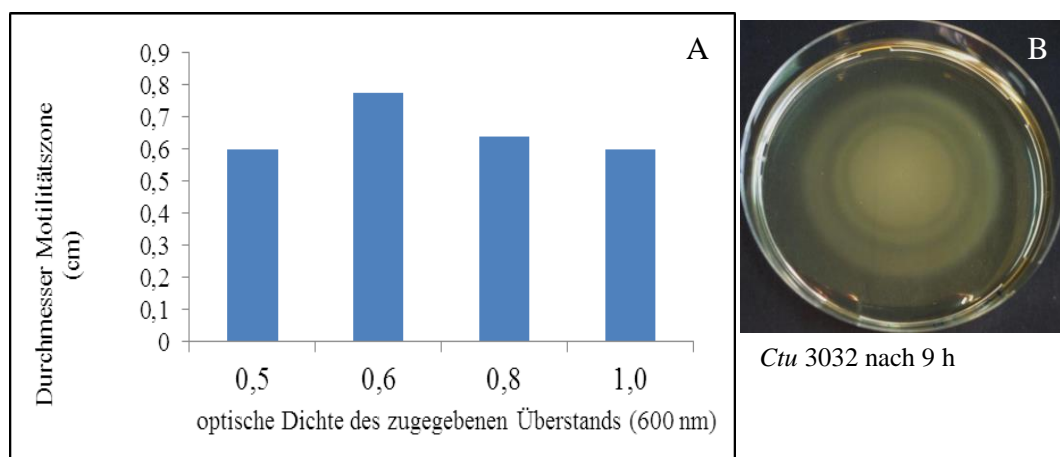


Abb. 29: A Durchschnittlicher Durchmesser (in cm) der Motilitätszone von BF2 auf LB-Weichagarplatten (0,3%) mit Zusatz von ES5-Überstand einer bestimmten optischen Dichte (OD_{600}) nach 18 h Inkubation bei 37°C . Die Daten stammen von mehrfachen Ansätzen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. **B Swimming von *C. turicensis* 3032** in LB-Weichagar (0,3%) nach 9 h Inkubation, mit einer typischen Heiligenschein-artigen Motilitätszone.

Es wurden ausschließlich runde Petrischalen verwendet, in denen jeweils nur ein Stamm angeimpft wurde. Bei den Transposoninsertionsmutanten wurde Kanamycin als Selektionsmarker zugesetzt, um die Möglichkeit einer spontanen Rückmutation ausschließen zu können. Zudem zeigte sich kein Unterschied, ob die Weichagarplatten mit Bakterien aus der stationären oder der logarithmischen Wachstumsphase angeimpft wurden.

Sowohl bei den Ansätzen mit Zusatz von Tween80, als auch bei denen mit Wildtyp-Überstand, zeigte sich deutlich häufiger Swimming als ohne Zusatz. Das Swimming führte allerdings nicht zu dem regelmäßigen Bild mit der typischen Motilitätszone, wie zum Beispiel bei *C. turicensis* 3032 (Abb. 29B), sondern war unregelmäßig und setzte erst nach einer Inkubationszeit von mehr als 12 Stunden ein. Erneut war eine große Diskrepanz der Mehrfachansätze zu beobachten.

Aufgrund der Schwierigkeit, den jeweils beobachteten Phänotyp zu beschreiben, sind die Aufnahmen einiger der durchgeführten Versuche in Abbildung 30-32 dargestellt.

Da es nicht gelungen ist, reproduzierbare Ergebnisse bezüglich des Schwimmings von Flagellenmutanten zu produzieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Flagellenbewegung unter bestimmten Bedingungen an- bzw. abgeschaltet wird. Dafür spricht auch, dass das bei *C. sakazakii* ES5 beobachtete Bild des Swimming nicht regelmäßig mit der typischen „Heiligenscheinbildung“ ist, sondern sich die Bakterien konfus in der Platte ausbreiten, häufig nierenförmig auf nur einer Seite der Animpfstelle.

Fakt ist, dass auch *C. sakazakii* ES5 prinzipiell zum Swimming in der Lage ist, dies aber in der Regel in halbfesten Medien nicht zeigt. Erst nach Stimulierung durch unbekannte Bestandteile des *C. sakazakii* ES5-Überstands bzw. durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung, kommt es nach mehr als 12-stündiger Inkubation zu der typischen durch Flagellen und Pili vermittelten Fortbewegung im Weichagar.

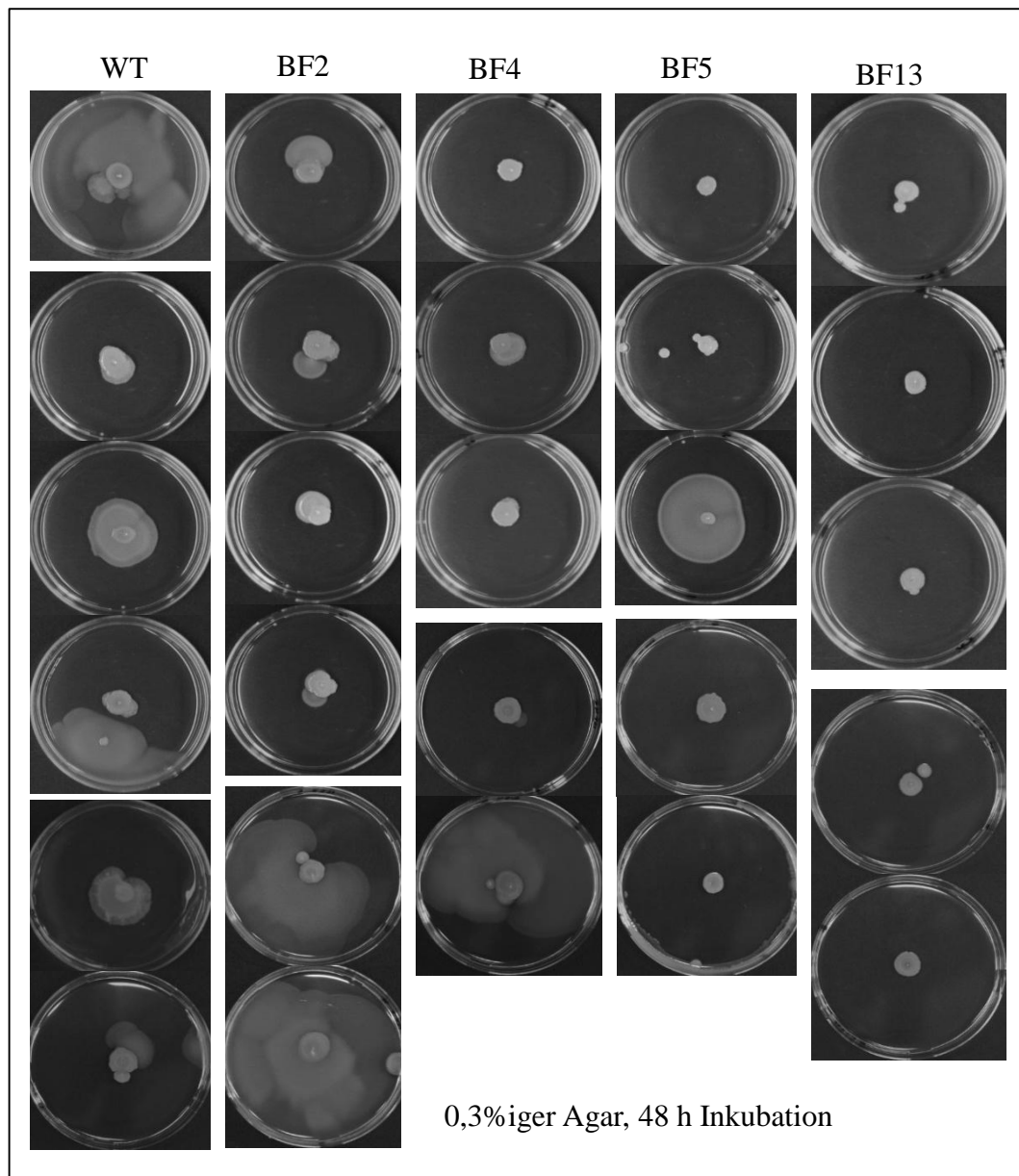


Abb. 30: Swarming von *C. sakazakii* ES5 und Flagellenmutanten in 0,3%igen Weichagar nach 48 h Inkubation bei 37°C.

Die Bilder stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

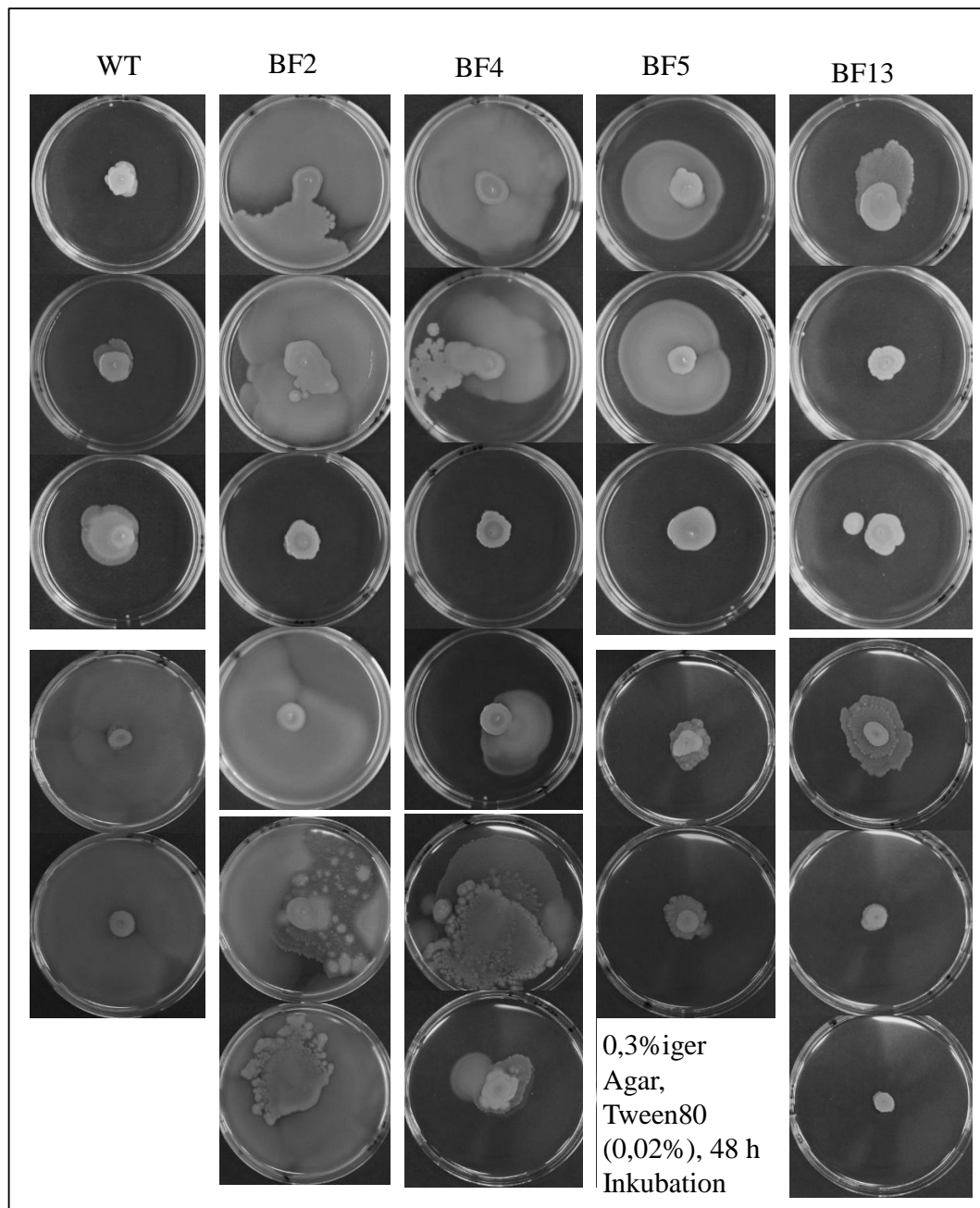


Abb. 31: Swarming von *C. sakazakii* ES5 und Flagellenmutanten in 0,3%igen Weichagar mit Zusatz des Detergenz Tween80 (0,02%) nach 48 h Inkubation bei 37°C.

Die Bilder stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

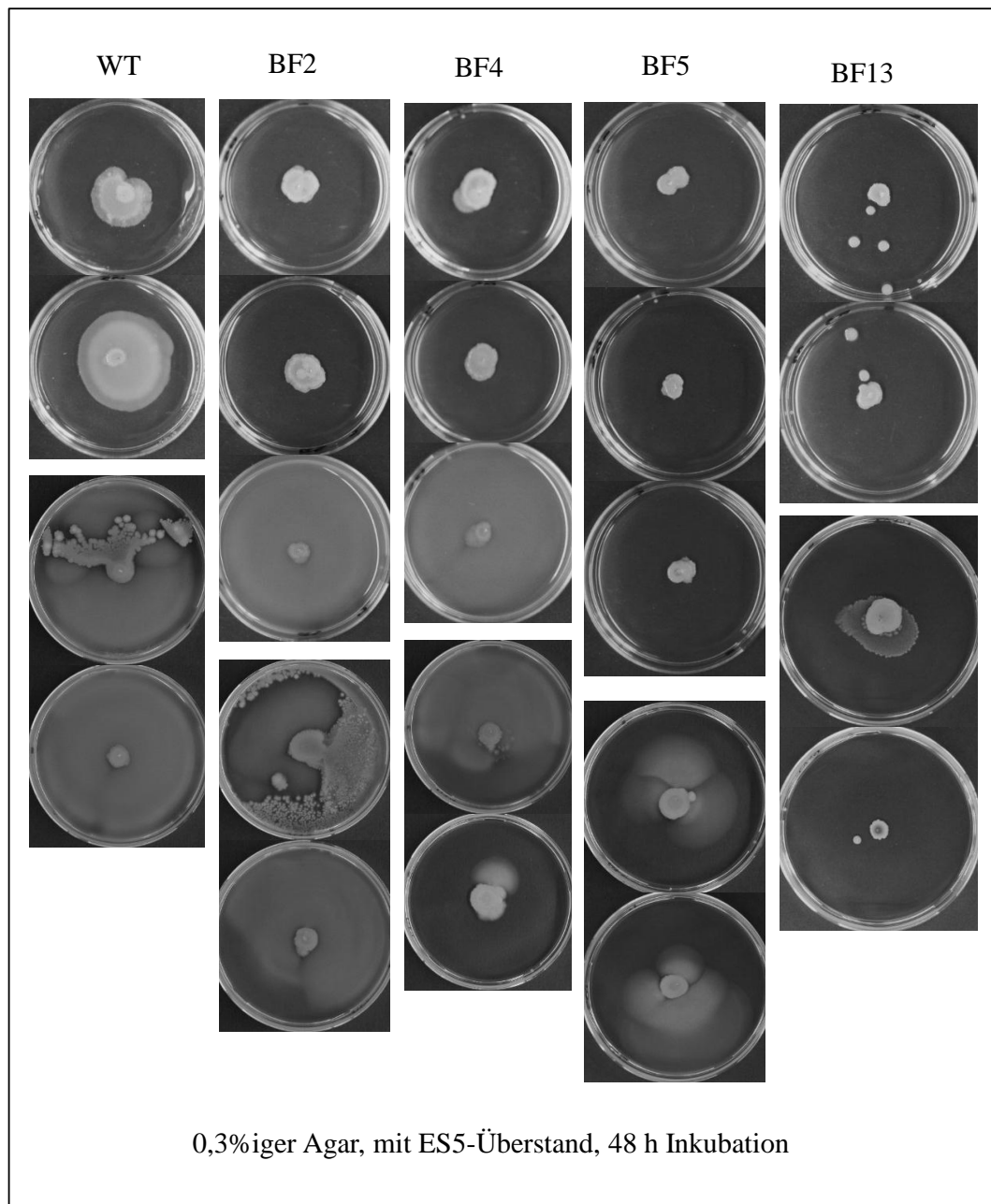


Abb. 32: Swarming von *C. sakazakii* ES5 und Flagellenmutanten in 0,3%igen Weichagar mit Zusatz von Wildtypüberstand nach 48 h Inkubation bei 37°C.

Die Bilder stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

6.2. Überprüfung der pH-Wert-Änderung beim Wachstum in LB-Flüssigmedium mit Zusatz von Glucose

Da Flagellen nicht nur bei der Motilität eines Bakteriums eine Rolle spielen, sondern auch bei der Sekretion von Proteinen und dem Austausch von Ionen, wurden die unter 6.1 beschriebenen Transposoninsertionsmutanten, bei denen durch Mutation die Flagellensynthese beeinträchtigt ist, weiterführend auf die Transportfunktion der Flagellen untersucht.

Für andere *Enterobacteriaceae*, z.B. Salmonellen, ist teils bekannt, dass der Austausch der H^+ -Ionen unter anderem über das Flagellen-Sekretionssystem erfolgt (Hirano et al., 2009; Lee and Harshey, 2012). Da es bei *C. sakazakii* diesbezüglich noch keine Erkenntnisse gibt, wurde die Änderung des pH-Wertes in Flüssigkultur überprüft (Abb. 33). Die Stämme wurden hierfür in Flüssigmedium mit und ohne Glucose-Zusatz über sechs Stunden inkubiert und die Änderung des pH-Wertes bestimmt.

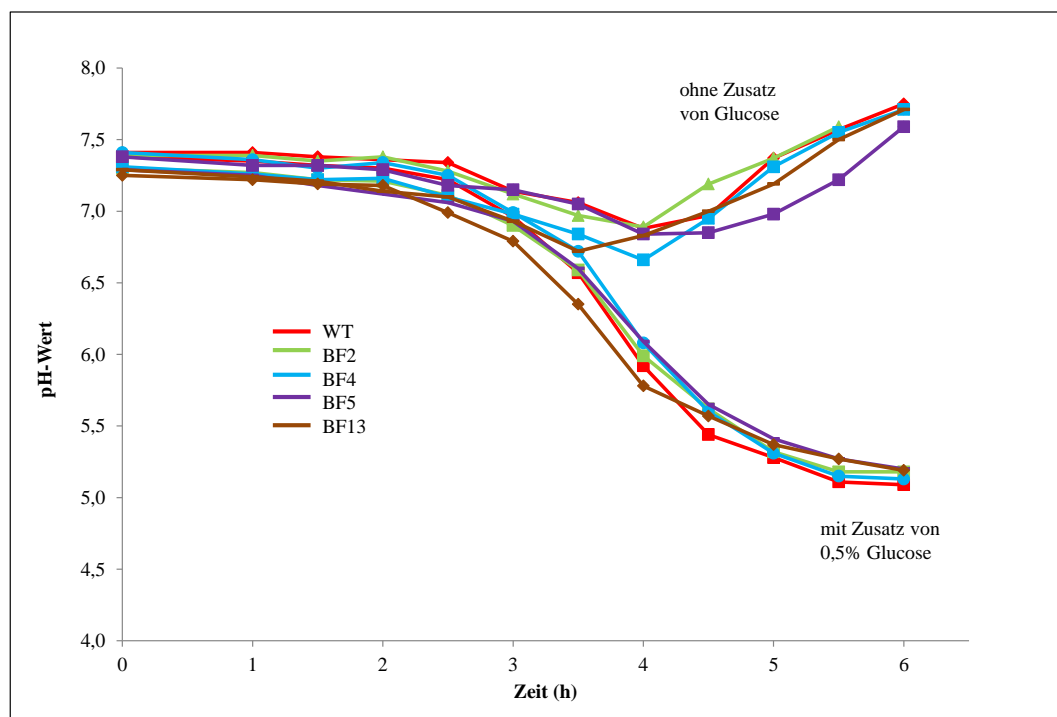


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf des pH-Werts in LB-Flüssigkultur von *C. sakazakii* ES5 und dessen Flagellenmutanten. Anzucht in LB-Medium (Mutanten: LB/Kan50) und bei 37°C, mit und ohne Zusatz von Glucose.

In der Abbildung 33 ist der Unterschied zwischen der pH-Wert-Entwicklung in den Ansätzen mit Glucose im Vergleich zu denen ohne Glucose-Zusatz bei allen Stämmen deutlich zu sehen. War Glucose im Medium vorhanden, kam es zu einem Absinken des pH-Wertes von ca. pH 7,3 auf pH 5,3. Stand dagegen keine Glucose zur Verfügung, stieg der pH-Werts auf ca. pH 7,6. an. Wäre das

Flagellensekretionssystem bei *C. sakazakii* ES5 an dem Austausch der H^+ -Ionen beteiligt, wäre bei der Entwicklung des pH-Wertes in der glucosehaltigen Flüssigkultur ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der aflagellaten Mutante zu erwarten. Da der pH-Wert beim Wildtyp und den Transposoninsertionsmutanten nicht voneinander abwich, scheint das Flagellensekretionssystem bei *C. sakazakii* ES5 nicht an dem Austausch von H^+ -Ionen beteiligt zu sein.

Flagellen als hoch komplexe, multipel regulierte Filamente, die bei diversen bakteriellen Vorgängen eine Rolle spielen, sind auch bei *C. sakazakii* von großer Bedeutung und müssen auf ihre Funktionalität und Regulation weiter untersucht werden.

7. Identifizierung von metabolisierbaren Kohlenstoffquellen

Die Virulenz eines Bakteriums ist auch von seiner Fähigkeit zur Bereitstellung von Energie abhängig, da ausreichend Energie eine Voraussetzung für die erfolgreiche Proliferation im Wirt ist und zum anderen für die Motilität sowie die Sezernierung von verschiedenen Faktoren, unter anderem auch Virulenzfaktoren. Deshalb ist die Frage, welche Kohlenstoffquellen (C-Quellen) von *Cronobacter sakazakii* ES5 metabolisiert werden können auch im Hinblick auf die Pathogenität interessant. Insbesondere insofern, als bestimmte Mutanten von dem Metabolisierungsmuster des Wildtyps abweichen oder es Unterschiede zwischen den *Cronobacter*-Spezies oder einzelnen Serotypen gibt.

In dieser Arbeit wurden hinsichtlich der Nutzung von 86 verschiedenen C-Quellen neben dem ES5 Wildtyp alle 28 Transposoninsertionsmutanten untersucht und zusätzlich weitere ausgewählte Isolate der Spezies *C. sakazakii* und *C. turicensis* sowie ein anderer Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Die Stämme wurden über Nacht in LB-Medium bei 37°C angezogen und nach Waschen mit PBS zur Entfernung von Medium- und Stoffwechselresten mit $OD_{600}=0,3$ in Reaktionsmedium ohne Kohlenhydratquelle angeimpft. Die einzelnen C-Quellen wurden separat in der Konzentration von 0,05 M zugegeben. Die Verwertung der eingesetzten Substrate lässt sich dadurch detektieren, dass die bei einer Metabolisierung entstehende respiratorische Aktivität den im Reaktionsmedium enthaltenen farblosen Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolet irreversibel zu dunkelblauem Formazan reduziert, was sich colorimetrisch messen lässt. In Vorversuchen wurde auch die Anzucht auf LB-Festmedium sowie auf Blutagar getestet, wobei sich aber LB-Flüssigmedium in diesem Fall als das am besten zur Anzucht geeignete Medium erwies. Außerdem wurde neben dem hier genutzten Reaktionsmedium (Kroger and Fuchs, 2009) auch das Reaktionsmedium nach Zusammensetzung von BIOLOG (Bochner, 2003; Bochner et al., 2001) getestet, das sich aber als weniger selektiv erwies. Um die optimale Bakteriendichte zu ermitteln, wurde die Bakterienkultur ebenfalls mit $OD_{600}=0,1/ 0,3/ 0,4$ und 0,5 im Reaktionsmedium angeimpft. Die Ergebnisse mit $OD_{600}=0,3$ lieferten am besten reproduzierbare Daten.

Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde in jeweils 100 µl Ansätzen in Mikrotiter-Platten (96-Well-Format) durchgeführt. Sowohl nach 24-stündiger wie

auch nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Extension bei $\lambda=620$ nm im Tecan Reader gemessen (Abb. 34).



Abb. 34: Metabolisierungsmuster von verwertbaren Kohlenstoffquellen durch *C. sakazakii* ES5 (A), ES5::Tn5-Mutante 31_1 (B) und *C. sakazakii* MHI 977 (C).

7.1. Vergleich der Stoffwechselaktivität bei *Cronobacter* spp.-Stämmen

Die Verwertung von verschiedenen Substraten variiert von Bakterienspezies zu Bakterienspezies, kann aber auch innerhalb einer Spezies abweichen. Aus diesem Grund wurde neben dem Metabolisierungsmuster der Transposoninsertionsmutanten auch die Verwertung der Carbon-Quellen bei folgenden Stämmen untersucht: Vier *C. sakazakii*-Isolate, nämlich *C. sakazakii* BAA-894 (Serotyp O1) (Kucerova et al., 2010), *C. sakazakii* CDC 0996-77 (Serotyp O1) (Mullane et al., 2008) und *C. sakazakii* NCTC 8155 (Serotyp O2), sowie *C. sakazakii* ATCC 29544 (Serotyp O1) (Iversen et al., 2007). Außerdem zwei *Cronobacter turicensis*-Stämme: nämlich *C. turicensis* 3032 (Serotyp O1) (Stephan et al., 2011) und *C. turicensis* E609 (Serotyp O3) und *S. Typhimurium* ST4/74 (Richardson et al., 2011) als zusätzlicher Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae*. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde in den Abbildungen *C. sakazakii* als *Csa* und *C. turicensis* als *Ctu* abgekürzt.

Der Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten *Cronobacter*-Stämme mit *S. Typhimurium* ST4/74 ergab einige interessante Unterschiede hinsichtlich der Nutzung bestimmter Kohlenstoffquellen (Tab. 15, Abb. 35). Gruppiert man die getesteten C-Quellen nach ihrem Vorkommen, so fällt auf, dass alle Kohlenstoffquellen, die von *Cronobacter* genutzt werden können, allerdings nicht von *S. Typhimurium* ST4/74, in der Umwelt oder in Lebensmitteln vorkommen. Die Substrate dagegen, die von *S. Typhimurium* ST4/74 gut metabolisiert werden, aber nicht von *Cronobacter* spp., sind nicht umweltassoziiert. Als besonders interessant fiel dabei D-Glucose-6-Phosphat auf. D-Glucose-6-Phosphat ist eine wichtige intrazelluläre C-Quelle, da Glucose in der Zelle als Phosphat vorliegt und bei vielen pathogenen Spezies wie *L. monozytogenes* und *S. Typhimurium* für

die intrazelluläre Proliferation essentiell ist. Die Verstoffwechselung ist jedoch bei vielen Pathogenen davon abhängig, ob sie sich intra- oder extrazellulär befinden, sie unterliegt also einer spezifischen Regulation.

Tab. 15: Vergleich des Metabolisierungsmuster von *C. sakazakii* und *S. Typhimurium*. Dargestellt sind C-Quellen, die von den beiden Spezies unterschiedlich verstoffwechselt werden. In der linken Spalte sind diejenigen Substanzen, die zwar von *C. sakazakii* metabolisiert werden, jedoch nicht von *S. Typhimurium*. In der rechten Spalte, diejenigen, die von *C. sakazakii* nicht genutzt werden können, dagegen aber von *S. Typhimurium*.

<i>Cronobacter</i> spp. +	<i>Cronobacter</i> spp. –
<i>S. Typhimurium</i> ST4/74 -	<i>S. Typhimurium</i> ST4/74 +
α -Methyl-D-Glucosid	D-Glucose-6-Phosphat
Arbutin	L-Asparagin
D-Cellobiose	L-Fucose
D-Galacturonsäure	Schleimsäure (nach 48h)
D-Raffinose	
D-Xylose	
Gentiobiose	
Lactose	
Salicin	
Sucrose	

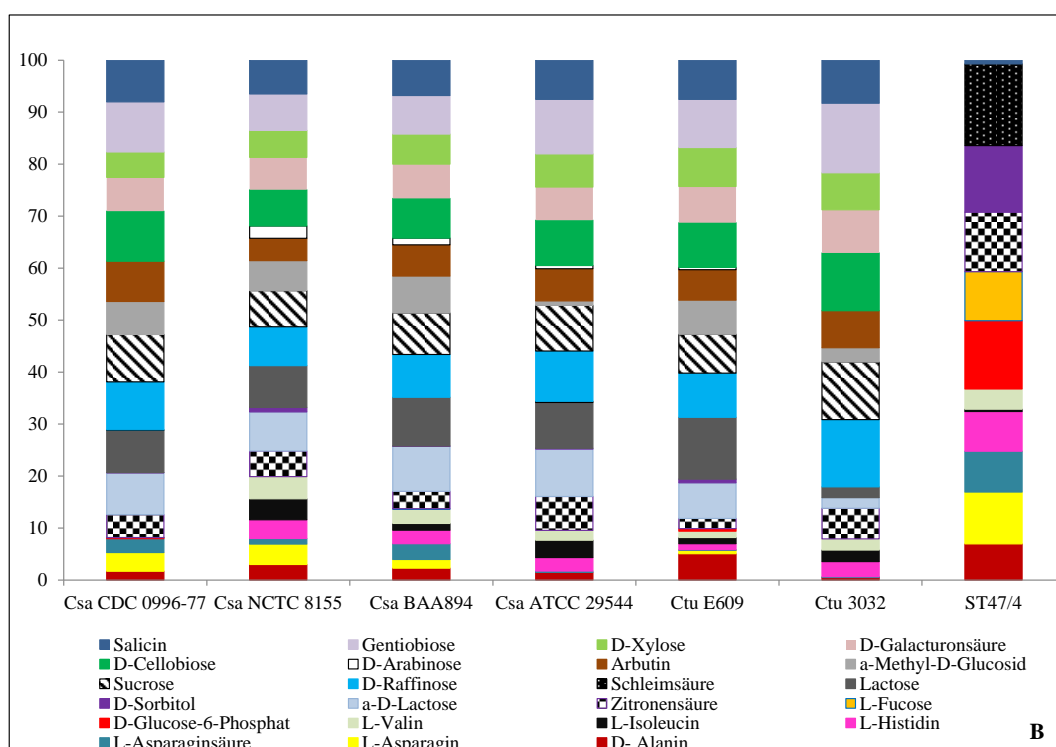
Der Vergleich aller Isolate ergab folgende Unterschiede (Abb. 35): α -D-Lactose als wichtiger Bestandteil der Milch kann von *S. Typhimurium* ST4/74 gar nicht metabolisiert werden, von *C. sakazakii* 977 und ATCC 29544 sehr gut und von den restlichen *Cronobacter*-Isolaten erst nach 48 Stunden. Bei Zitronensäure ist die Metabolisierung durch *C. turicensis* E609 geringer als bei allen anderen Stämmen. D-Arabinose kann nur vom Isolat *C. sakazakii* NCTC 8155 gut verstoffwechselt werden, bei *C. sakazakii* BAA-894 ist nur eine geringe Metabolisierung zu beobachten, alle anderen Stämme sind negativ. D-Sorbitol wird von *S. Typhimurium* ST4/74 abgebaut, von *C. turicensis* E609 nach 48 Stunden und von den anderen Stämmen gar nicht. Auch bei den Aminosäuren waren Unterschiede erkennbar. Die neutrale Aminosäure D-Alanin wird von *C. turicensis* 3032 nicht metabolisiert, von *C. sakazakii* ES5, CDC 0996-77 und ATCC 29544 nur teilweise und von allen übrigen getesteten Stämmen gut. Bei den sauren Aminosäuren L-Asparagin und L-Asparaginsäure ist *S. Typhimurium* ST4/74 zur Metabolisierung in der Lage, *C. turicensis* kann die Asparaginsäure gar nicht verwerten. Bei allen anderen Stämmen ist Verstoffwechselung gering bis mäßig. L-Isoleucin wird von *S. Typhimurium* ST4/74 nicht abgebaut, die restlichen Isolate metabolisieren die neutrale Aminosäure, teils jedoch erst nach

48 Stunden oder nur in geringem Ausmaß. L-Valin, ebenfalls eine neutrale Aminosäure, und L-Histidin, eine heterozyklische Aminosäure, werden wie L-Asparginsäure von *S. Typhimurium* ST4/74 und den *C. sakazakii*-Stämmen BAA-894 und NCTC 8155 gut verstoffwechselt. Auch *C. sakazakii* ATCC 29544 und *C. turicensis* 3032 sind zur Umsetzung in der Lage. Lediglich *C. sakazakii* CDC 0996-77 ist diesbezüglich negativ. M-Inositol, das auch zur Speziescharakterisierung herangezogen wird, wird von *C. sakazakii* BAA-894 und *S. Typhimurium* ST4/74 gar nicht metabolisiert, von den *C. sakazakii*-Stämmen ES5, ATCC 29544, NCTC 8155 sowie *C. turicensis* 3032 und E609 dagegen sehr gut. Bei *C. sakazakii* CDC 0996-77 ist die Umsetzung schwach.

Die eingefügten Mutationen in den 28 untersuchten Transposonmutanten scheinen kaum Einfluss auf die Nutzung von C-Quellen außerhalb der Wirtszelle zu haben. Sowohl bei den C-Substraten, die in Lebensmittel vorkommen, als auch bei Substraten aus der Umwelt gab es nur minimale Abweichungen. Bei den Kohlenstoffverbindungen, die im Wirt vorkommen, d.h. bei den am allgemeinen Metabolismus beteiligten Zuckern und vor allem bei den Aminosäuren, gab es zum Teil erhebliche Unterschiede. Besonders bei einzelnen Pigmentmutanten, wie 31_1, 68_1, 69_1, 79_1, sowie bei den Flagellenmutanten BF5 und BF13, und der Serummutante MTP 51_C4. Im Folgenden werden die Gruppen separat besprochen.

		Csa Es5	Csa CDC 0996-77	Csa NCTC 8155	Csa BAA894	Csa ATCC 29544	Ctu E609	Ctu 3032	ST47/4
Aminosäuren	D- Alanin	0,029	0,111	0,299	0,247	0,102	0,582	0,031	0,398
	L-Asparagin	0,138	0,232	0,389	0,175	0,000	0,075	0,000	0,571
	L-Asparaginsäure	0,000	0,173	0,107	0,322	0,018	0,016	0,013	0,447
	L-Histidin	0,187	0,000	0,358	0,276	0,180	0,132	0,187	0,437
	L-Isoleucin	0,138	0,000	0,401	0,140	0,230	0,137	0,143	0,026
Lebensmittel	L-Valin	0,140	0,000	0,424	0,292	0,130	0,140	0,141	0,222
	D-Glucose-6-Phosphat	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,055	0,000	0,750
	L-Fucose	0,000	0,001	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,539
	Zitronensäure	0,459	0,286	0,489	0,357	0,449	0,227	0,381	0,654
	a-D-Lactose	0,417	0,518	0,747	0,919	0,630	0,788	0,133	0,000
Umwelt	D-Sorbitol	0,000	0,002	0,085	0,009	0,009	0,078	0,000	0,732
	Lactose	0,491	0,527	0,798	0,995	0,609	1,367	0,134	0,000
	Schleimsäure	0,008	0,005	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,897
	D-Raffinose	0,732	0,597	0,744	0,877	0,667	0,977	0,841	0,000
	Sucrose	0,699	0,589	0,686	0,848	0,607	0,858	0,721	0,000
	a-Methyl-D-Glucosid	0,412	0,408	0,576	0,756	0,060	0,755	0,177	0,000
	Arbutin	0,488	0,501	0,427	0,639	0,427	0,673	0,463	0,000
	D-Arabinose	0,022	0,000	0,235	0,137	0,043	0,048	0,000	0,000
	D-Cellobiose	0,730	0,621	0,690	0,814	0,600	0,989	0,721	0,000
	D-Galacturonsäure	0,523	0,418	0,620	0,703	0,439	0,800	0,541	0,000
	D-Xylose	0,532	0,316	0,514	0,612	0,440	0,860	0,461	0,000
	Gentiobiose	0,757	0,623	0,699	0,791	0,723	1,065	0,869	0,000
	Salicin	0,590	0,517	0,643	0,720	0,520	0,864	0,538	0,041

A



B

Abb. 35: Metabolisierung von C-Quellen durch *C. sakazakii*, *C. turicensis* und als Vergleich einem *S. Typhimurium*-Isolat. A Extensionswerte der colorimetrischen Messung bei 620 nm (Mittelwert aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen) **B** Die Gesamtstoffwechselaktivität jedes Stammes bei den hier aufgeführten C-Quellen wurde auf 100% gesetzt und die einzelnen Substrate anteilig dargestellt.

7.2. Charakterisierung des Kohlenstoffmetabolismus bei *C. sakazakii* ES5-Transposoninsertionsmutanten

Das Screening der 28 Transposoninsertionsmutanten bezüglich ihres Metabolismus von den hier untersuchten Kohlenstoffquellen wurde zum einen auf Auffälligkeit innerhalb der Mutanten und zum anderen auf Unterschiede zum *C. sakazakii* ES5 Wildtyp hin überprüft. Bei einem Teil der eingesetzten Substrate wichen keine der getesteten Transposoninsertionsmutanten vom Wildtyp ab (Tab. 16). Bei manchen Kohlenstoffquellen waren selbst die Ergebnisse des Wildtyps nicht eindeutig und variierten von Versuch zu Versuch, z.B. bei L-Histidin, Leucin, Valin, D-Alanin und Äpfelsäure. Andere Substrate konnten erst nach 48h vollständig verstoffwechselt werden, z.B. α -D-Lactose, Lactulose, Turanose und Tween 80. Die Extinktionswerte aller Substrate sind im Anhang in den Tabellen 19-24 im Anhang aufgeführt.

Tab. 16: C-Quellen, bei deren Verstoffwechselung sich alle in dieser Arbeit untersuchten Transposoninsertionsmutanten wildtypisch verhalten.

Metabolisierbar	Nicht metabolisierbar
Adenosin	Adonitol
α -D-Glucose	D-Arabinose
D-Cellobiose	Dulcitol
D-Fructose	D-Maleinsäure
D-Galactose	D-Sorbitol
D-Glucosamin	Kreatin
D-Mannitol	L-Arabitol (nur teilweise getestet)
D-Melibiose	L-Fucose
D-Raffinose	L-Lysin
D-Trehalose	L-Methionin
Gentiobiose (erst nach 48h)	L-Phenylalanin
Glycerol	
Inosin	
L-Arabinose	
Maltose	
Maltotriose	
N-Acetyl-D-Glucosamin	
N-Acetyl- β -Mannosamin	
Isomaltulose	
Sucrose	
Uridin	
γ -Amino-Buttersäure	
Zitronensäure	

Zur Übersichtlichkeit wurden die 86 getesteten C-Quellen anhand ihres Vorkommens beziehungsweise ihrer Funktion in vier Gruppen eingeordnet, um so

die Auswertung zu erleichtern: Die Gruppe der Aminosäuren, Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels als C-Quellen und schließlich C-Quellen, die in der Umwelt vorkommen, unterteilt in Substrate primär aus Lebensmittel und Substrate aus der natürlichen Umgebung, wie Pflanzen oder Erdboden. Einige Substrate sind auf Grund des Vorkommens in verschiedenen Bereichen in zwei Gruppen vertreten.

7.2.1. Aminosäuren als Kohlenstoffquelle

Besonders interessant war das Metabolisierungsmuster bei den Aminosäuren. Die Mutanten wichen hier teils deutlich vom Wildtyp ab. Vor allem die Transposoninsertionsmutanten mit Mutation im Bereich des Energiestoffwechsels zeigten deutliche Unterschiede (Abb. 36).

Bei allen gescreenten Mutanten fiel in erster Linie die Variabilität bei der Metabolisierung von L-Asparagin und L-Asparaginsäure auf. Bei Asparaginsäure vor allem im Vergleich zum Wildtyp, der diese Aminosäure gar nicht verstoffwechselt. L-Glutamin und L-Glutamat, wie L-Asparagin und L-Asparaginsäure, saure Aminosäuren, wurden dagegen vom Wildtyp metabolisiert. Die meisten Transposoninsertionsmutanten waren dazu ebenfalls in der Lage. L-Glutamat konnte lediglich von dem Stamm 68_1 fast gar nicht als C-Quelle genutzt werden, gering war die Verstoffwechslung auch durch die Mutanten 31_1, 69_1 und 79_1.

Relativ starke Unterschiede zwischen den Stämmen konnten auch bei der neutralen Aminosäure D-Alanin und der heterozyklischen Aminosäure L-Histidin festgestellt werden. D-Alanin wurde vom Wildtyp nur in geringem Maß verstoffwechselt, die Transposoninsertionsmutanten waren dazu aber fast alle in der Lage. Lediglich die BF5-Mutante nutzte die Aminosäure gar nicht als C-Quelle. L-Histidin wurde dagegen zwar vom Wildtyp teilweise metabolisiert, die Stämme BF5, BF8, BF13, 51_C4 sowie 2_1, 31_1, 67_1, 69_1 und 79_1 waren dazu aber gar nicht oder nur in geringem Ausmaß in der Lage.

Bei der Serummutante 51_C4 war die Metabolisierung der neutralen Aminosäuren L-Serin und L-Threonin gering und wie einige der Biofilmmutanten konnte sie L-Valin nicht nutzen. L-Threonin wurde von den Stämmen 31_1, 69_1 und 79_1 gar nicht verstoffwechselt.

Die nicht-proteinogene Aminosäure L-Ornithin konnte vom Wildtyp und den meisten Mutanten nicht als C-Quelle genutzt werden. Lediglich die Stämme 31_1

verstoffwechselte L-Ornithin gut - BF14, 51_C6, 3_1, 67_1, 76_1 und 79_1 waren nach 48 Stunden in geringem Maß dazu in der Lage.

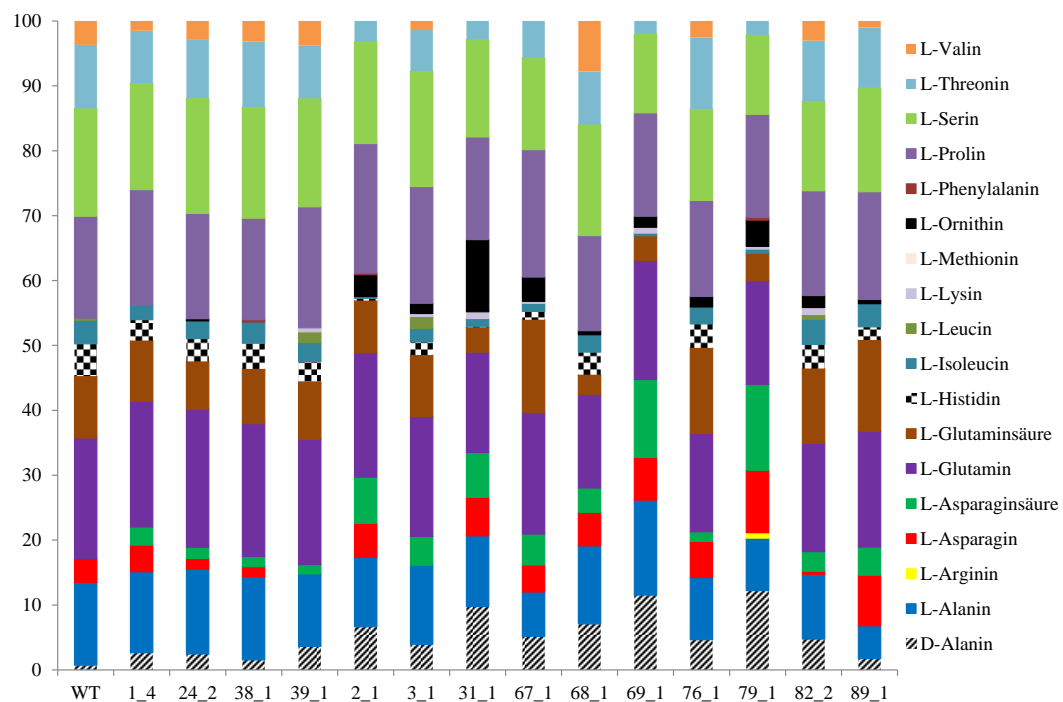
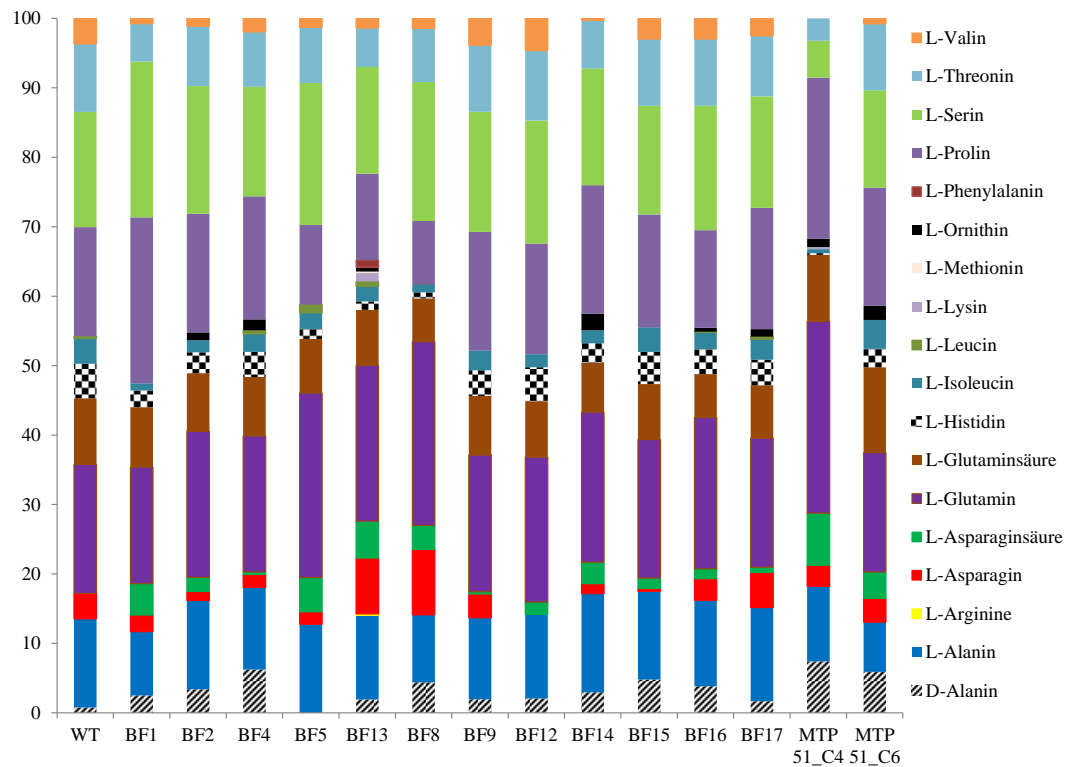


Abb. 36: Metabolisierung von Aminosäuren durch *C. sakazakii* ES5 (WT) sowie durch die untersuchten **A** Biofilm- und Serummutanten und **B** Pigmentmutanten. Die Gesamtheit der Aminosäuren-Stoffwechselaktivität jedes Stammes wurde gleich 100% gesetzt und die einzelnen Aminosäuren anteilig dargestellt.

7.2.2. Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels als Kohlenstoffquelle

Die Nutzung von Kohlenstoffverbindungen, die in Stoffwechselvorgängen im Körper entstehen und eine Rolle spielen, ist hinsichtlich der Virulenz eines Bakteriums interessant. Jene Substrate stehen den Mikroorganismen im Wirt zur Verfügung, die Fähigkeit diese C-Quellen zur Energiegewinnung nutzen zu können, ist somit essentiell für die Persistenz und die Vermehrung der Bakterien im Wirt. In Abbildung 35 A zum Beispiel, ist zu erkennen, dass *S. Typhimurium* im Gegensatz zu *Cronobacter* spp. in der Lage ist, die Substrate L-Fucose und Glucose-6-Phosphat umzusetzen und somit diese als intrazelluläre Energiequellen zu nutzen. Das Metabolisierungsmuster von *C. sakazakii* ES5 und von seinen hier untersuchten Mutanten ist in Abbildung 37 dargestellt.

Das Screening der Mutanten ergab bei einzelnen im Metabolismus vorkommenden C-Quellen Unterschiede im Vergleich zum ES5-Wildtyp:

2'Desoxythymidin wurde vom Wildtyp und den meisten Transposoninsertionsmutanten als Substrat verwendet. Bei den Mutanten 68_1, 69_1, BF1 und BF15 war dies vermindert. Die Oxalsäure wurde in der Regel in geringem Maße verstoffwechselt, nicht genutzt werden konnte das Substrat allerdings von den Stämmen MTP 51_C4, 69_1 und 79_1 und nur schlecht von 31_1, BF2, BF5, BF13 und 68_1. Monomethylsuccinat wurde vom Wildtyp, BF5- und BF13-Mutanten nicht metabolisiert. Die Stämme BF17, 51_C4, 51_C6, 1_4, 38_1, 31_1, 67_1 und vor allem 24_2, 2_1 und 79_1 konnten diese Kohlenstoffquelle gut nutzen. Methylpyruvat wurde vom Wildtyp und den meisten Mutanten gut verstoffwechselt. Bei den Mutanten 51_C4 und 31_1 war die Umsetzung vermindert. Die Fumarsäure konnte vom Wildtyp und fast allen Mutanten teilweise, meist erst nach 48 Stunden, umgesetzt werden. Bei den BF2- und BF5-Stämmen war die Metabolisierung aber sehr gering. Lediglich die BF12-Mutante zeigte gar keine Stoffwechselaktivität mit Fumarsäure als C-Quelle. Die γ -Aminobuttersäure konnte von den Mutanten BF5, BF13, BF8 sowie von 79_1 und 89_1 weniger gut metabolisiert werden als vom Wildtyp und den restlichen Mutanten (Abb. 37).

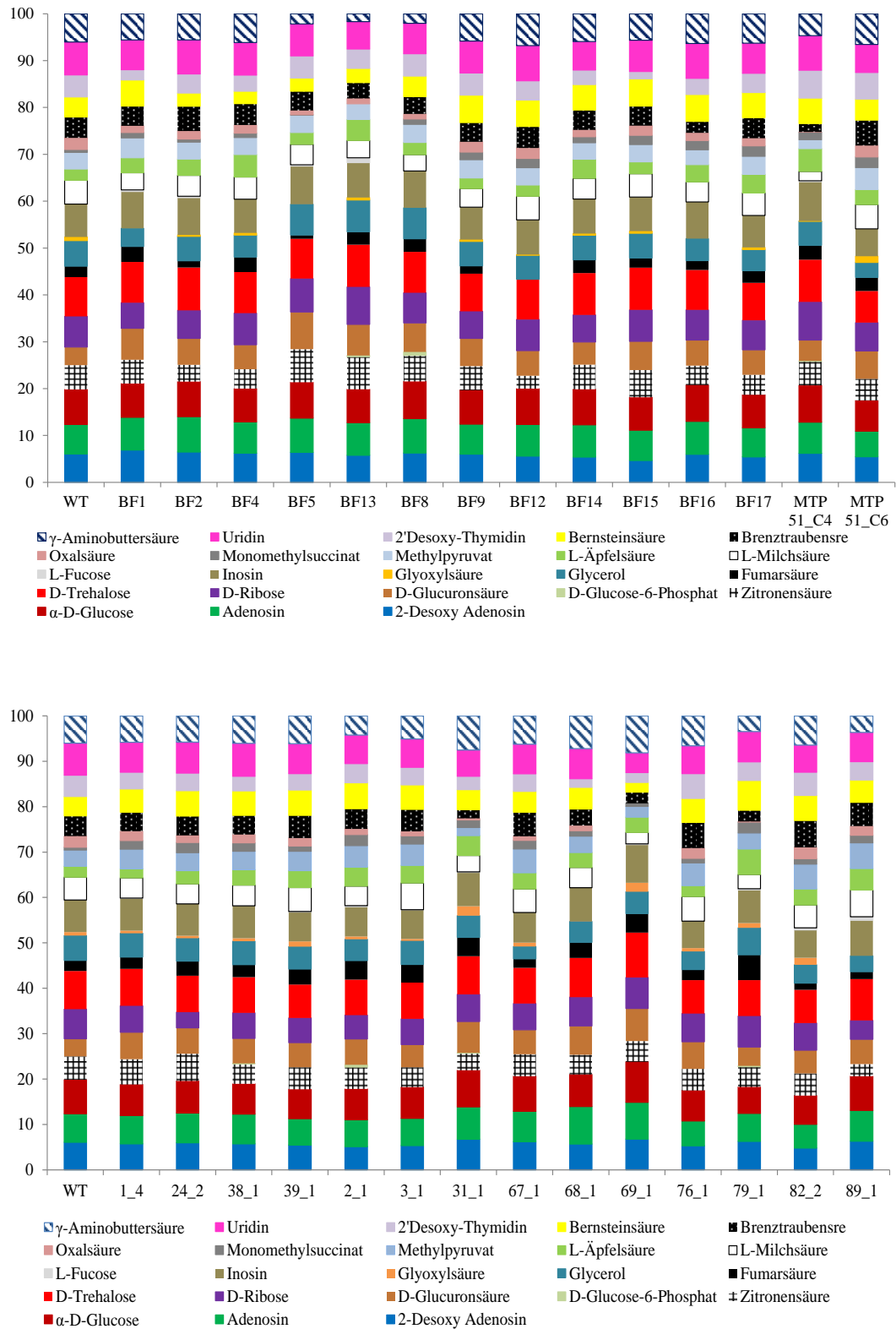


Abb. 37: Metabolisierung von Stoffwechselzwischenprodukten als C-Quellen durch *C. sakazakii* ES5 (WT) sowie durch die untersuchten **A** Biofilm- und **B** Pigmentmutanten. Die Gesamtheit der Aminosäuren-Stoffwechselaktivität jedes Stammes wurde gleich 100% gesetzt und die einzelnen Aminosäuren anteilig dargestellt.

7.2.3. Lebensmittel und Lebensmittelzusätze als Kohlenstoffquelle

Da die Infektion mit *Cronobacter* spp. in der Regel über die orale Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln stattfindet, ist es interessant, welche in Lebensmittel vorkommenden C-Quellen von dem Bakterium als Energiequellen genutzt werden können (Abb. 38). Von den gescreenten Substraten waren lediglich Essigsäure, Kreatin, D-Äpfelsäure, L-Arabitol und Schleimsäure vom Wildtyp nicht verstoffwechselt worden. Einige Kohlenstoffquellen, z.B. Turanose, Tween80, Lactose und Lactulose wurden erst nach 48 Stunden umgesetzt.

Unterschiede zwischen den Transposoninsertionsmutanten und dem Wildtyp gab es bei folgenden C-Quellen:

Turanose konnte von der 68_1-Mutante gar nicht verstoffwechselt werden und von den Stämmen 69_1 und 31_1 nur teilweise. Die Mutanten BF15, 51_C6 und 76_1 waren dagegen schon nach 24 Stunden zur Umsetzung in der Lage. Tween 20 wurde vom Wildtyp und von einigen Mutanten in geringem Maß als Energiequelle genutzt, nicht aber von den Stämmen BF1, BF5, BF8, BF9, BF16, 51_C4, 3_1, 31_1, 68_1, 69_1 und 79_1. Tween 80 konnte dagegen von allen Stämmen metabolisiert werden. Putrescin wurde prinzipiell verstoffwechselt, von den Mutanten BF1, BF5, BF8 und BF13 sowie von 51_C4, 79_1 allerdings nur teilweise. Die Stämme 69_1 und 89_1 sind erst nach 48 Stunden zu einer partiellen Umsetzung von Putrescin in der Lage. Bei Pektin variierte das Ausmaß der Umsetzung. Lactulose wurde in der Regel erst nach 48 Stunden metabolisiert. Bei der 2_1-Mutante war die Verstoffwechselung nach 24 Stunden abgeschlossen. Bei den Stämmen BF5, BF13 und 69_1 wurde nur ein Teil des Substrats verstoffwechselt und BF1, 31_1 und 68_1 setzten es gar nicht um. Die Lactose als wichtiger Bestandteil der Milch, ist bei *C. sakazakii* von besonderem Interesse. Normalerweise war das Substrat nach 48 Stunden vollständig metabolisiert. Bei den Stämmen BF5, 2_1 und 3_1 wurde allerdings nur ein geringer Teil umgesetzt. Bei α -D-Lactose war die Nutzung zusätzlich auch bei den Mutanten BF2, BF13 und BF8 reduziert (Abb. 38).

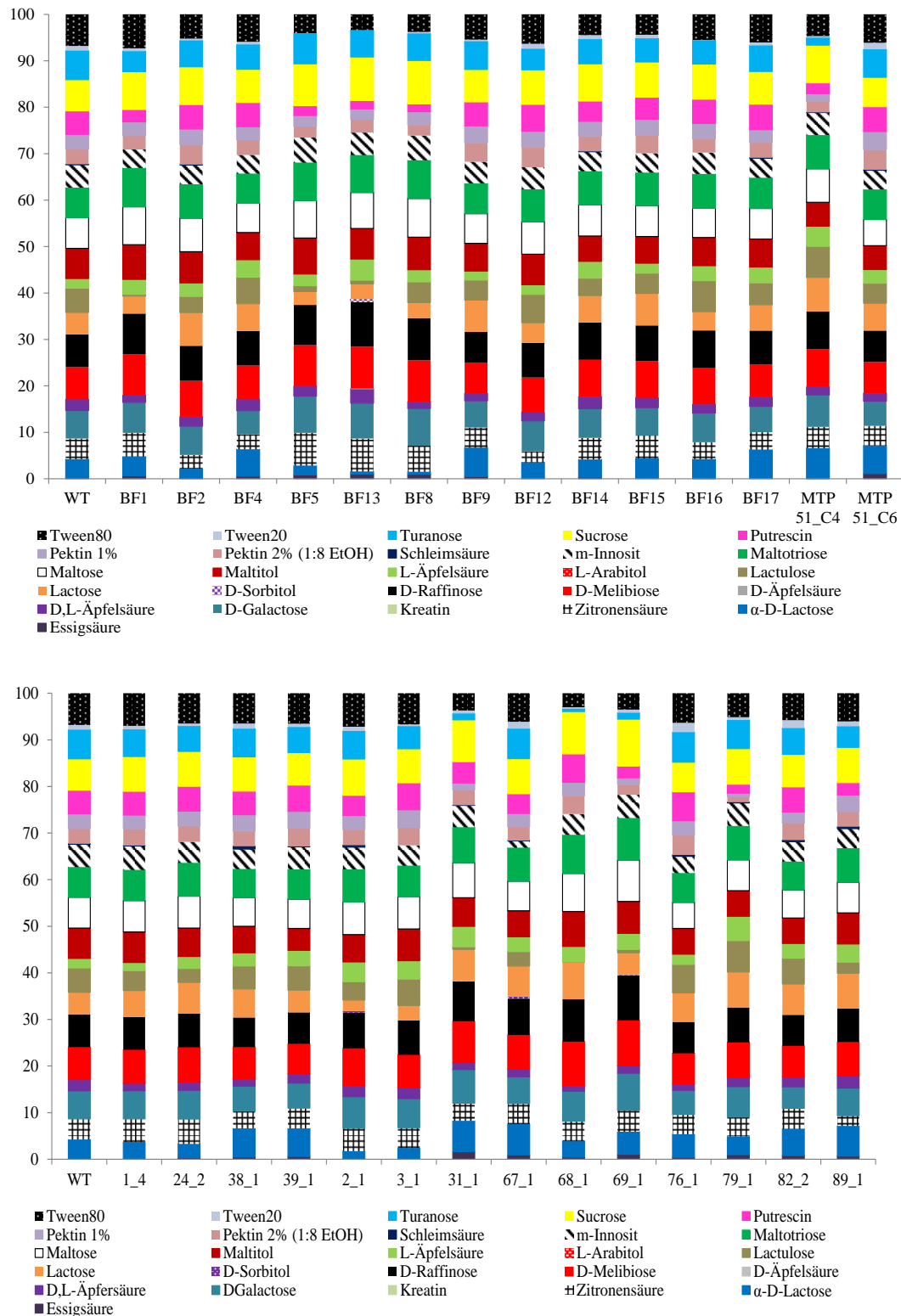
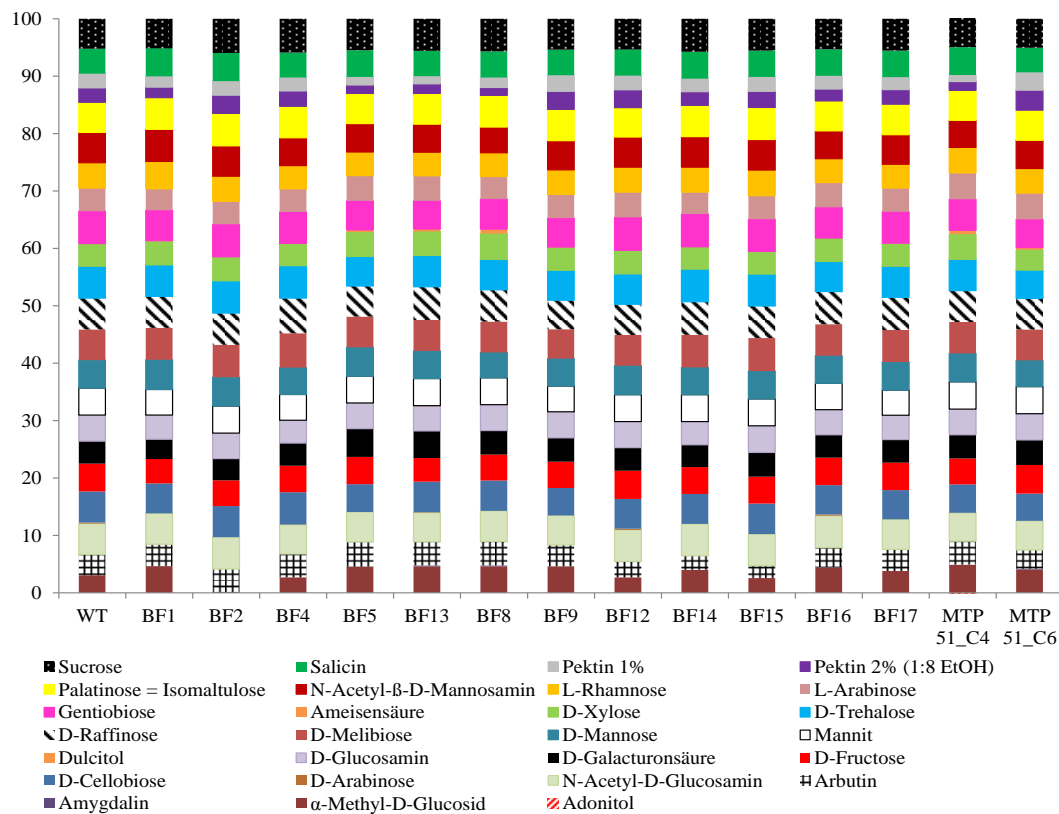


Abb. 38: Metabolisierung von in Lebensmittel enthaltenen C-Quellen durch *C. sakazakii* ES5 (WT) sowie durch die untersuchten **A Biofilm- und Serummutanten und **B** Pigmentmutanten. Die Gesamtheit der Stoffwechselaktivität jedes Stammes wurde gleich 100% gesetzt und die einzelnen Kohlenhydratquellen anteilig dargestellt.**

7.2.4. Vorwiegend umweltassoziierte Substrate als Kohlenstoffquelle

Fast alle in der Umwelt vorkommenden C-Quellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnten von den ubiquitär vorkommenden *Cronobacter* spp. umgesetzt werden. Lediglich Adonitol, Amygdalin, D-Arabinose, Dulcitol und Ameisensäure konnten vom ES5 Wildtyp nicht metabolisiert werden. Die Ameisensäure wurde allerdings in geringem Maße von einigen Mutanten verstoffwechselt: BF1, 51_C4, und 2_1 waren dazu in der Lage und teilweise auch die Stämme BF8, BF13, BF16 und 79_1. Bei dem α -Methyl-D-Glucosid, das erst nach 48 Stunden verstoffwechselt wurde, war BF2 als einzige Transposoninsertionsmutante nicht in der Lage, das Substrat zu metabolisieren. Ansonsten konnten keine deutlichen Abweichungen zwischen den Transposoninsertionsmutanten und dem Wildtyp beobachtet werden (Abb. 39).



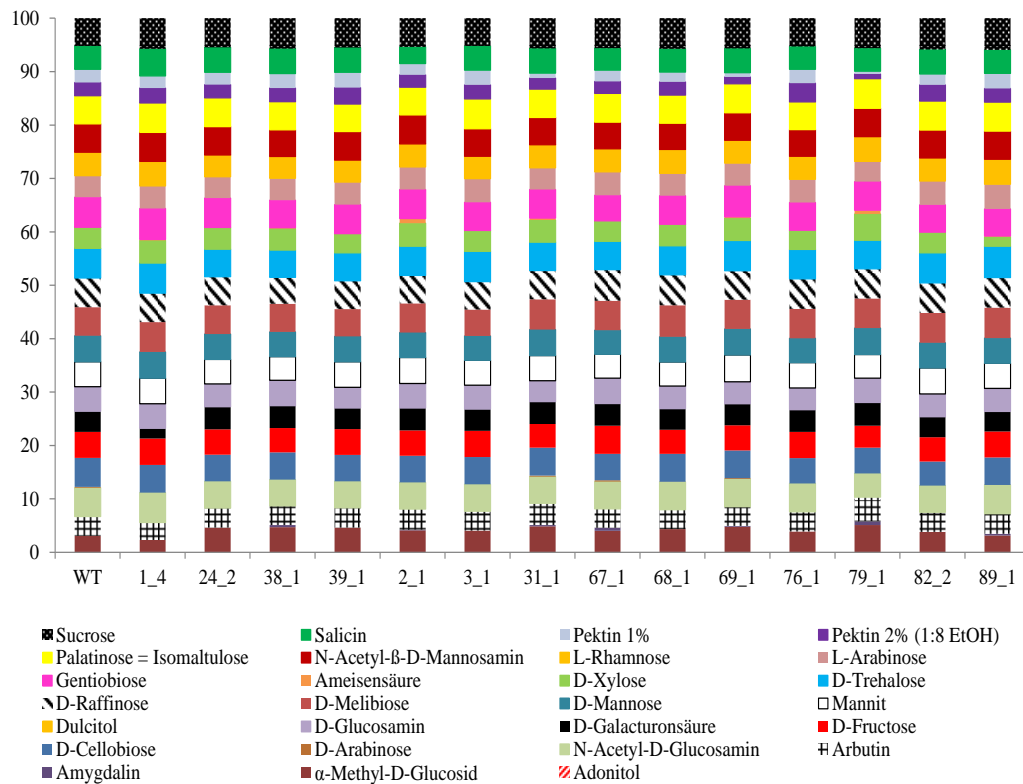


Abb. 39: Metabolisierung von in der Umwelt vorkommenden C-Quellen durch *C. sakazakii* ES5 (WT) sowie durch die untersuchten **A** Biofilm- und Serummutanten und **B** Pigmentmutanten. Die Gesamtheit der Stoffwechselaktivität jedes Stammes wurde gleich 100% gesetzt und die einzelnen Kohlenhydratquellen anteilig dargestellt.

V. DISKUSSION

1. Identifizierung von potentiellen Virulenzfaktoren

Um potentielle Virulenzfaktoren von *C. sakazakii* zu erkennen und näher zu charakterisieren wurden in dieser Arbeit Transposoninsertionsmutanten ES5::Tn5 des klinischen Isolats *C. sakazakii* ES5 in Zellkultursystemen und darüber hinaus untersucht. Die untersuchten Transposoninsertionsmutanten des *C. sakazakii* ES5-Stammes stammen aus einer Transposonmutantenbank des Instituts für Lebensmittelsicherheit und -hygiene der Universität Zürich. Die ausgewählten Stämme sind aus drei Bereichen: Zum einen handelt es sich um Mutanten, bei denen die Mutation zu einer quantitativen oder qualitativen Änderung der Biofilmbildung führt, die von Hartmann *et al.* in Biofilm-Mikrotiter-Assays getestet wurden (Hartmann *et al.*, 2010). Diese Mutanten sind in dieser Arbeit als Biofilmmutanten bezeichnet. Die zweite große Gruppe, genannt Pigmentmutanten, stammen aus einem Pool von Mutanten, bei denen die Transposoninsertion zu einer Veränderung des für *C. sakazakii* ES5 typischen gelben Pigments führt. Sie wurden von Johler *et al.* anhand ihrer weißen Koloniefärbung ausgewählt (Johler *et al.*, 2010). Zu der dritten Gruppe gehören zwei Mutanten aus einer Serum-Resistenz-Studie, bei denen das Überleben in 50%-igem humanen Serum (HPS=human pooled serum; Serumsensitivitätstest) nach 120 Minuten im Vergleich zum Wildtyp vermindert war (Schwizer *et al.*, 2013). Zur weiteren Klassifizierung wurden die 28 ausgewählten Mutanten auf Basis der Annotation der Proteinfunktion in orthologe Gruppen (COG) eingeordnet.

Es wurden Stämme aus möglichst unterschiedlichen Gruppen untersucht, um viele verschiedene potentielle Virulenzkomponenten abzudecken. Die Mutationen betreffen dabei die Bereiche der Energieproduktion und -umwandlung, des Metabolismus, der Carotinoid-Biosynthese, der Zellwandsynthese und Zellmembranbestandteile sowie die Bereiche der Motilität, der Zellteilung, des Zellzyklus und der Zykluskontrolle. Teilweise wurden zwei Mutanten mit unterschiedlicher Position der Transposoninsertion im selben Gen ausgewählt, um die Auswirkung der Insertionsstelle auf den Phänotyp vergleichen zu können.

Als Positivkontrolle diente in den Zellkultur-Assays die *ompA*-Deletionsmutante (Schauer, unveröffentlicht), da das OmpA-Protein als Virulenzfaktor bei *C. sakazakii* bereits mehrfach beschrieben ist und in die Invasion von eukaryotischen Zellen involviert ist (Jaradat et al., 2014).

1.1. Die Rolle der Biofilmproduktion für die Virulenz von *C. sakazakii* ES5

Unter den in dieser Arbeit untersuchten Biofilmmutanten befinden sich Stämme, bei denen die Mutation ein Gen betrifft, das für die Flagellensynthese und -regulation codiert und somit die Motilität beeinflusst. Des Weiteren codieren die unterbrochenen Gene für Proteine aus dem Bereich der Energieproduktion und -umwandlung, des allgemeinen Metabolismus sowie der Zellteilung und dem Zellzyklus.

Als Biofilmbildner besitzt *C. sakazakii* eine spezielle Eigenschaft seine Tenazität zu erhöhen, die typischerweise bei Mikroorganismen aus der Umwelt vorkommt. Ein Biofilm ist ein Zusammenschluss von Bakterienzellen, die eingebettet in extrazelluläre Matrix an Oberflächen haften. Innerhalb des Biofilms können die Bakterien geschützt vor Umwelteinflüssen wie Austrocknung, der Immunantwort oder Antibiotika proliferieren und damit ihr Überleben in der Umwelt signifikant erhöhen. Die Ausbildung des Biofilms beginnt mit der irreversiblen Anhaftung der Bakterien an eine Oberfläche, gefolgt von bakterieller Teilung und der Produktion von extrazellulärer Matrix und schließlich dem Ausbau der Matrix und der Ausbreitung der Bakterien (Solano et al., 2014). Biofilm ist maßgeblich an der Motilität der Mikroorganismen über Swarming beteiligt und variiert je nach Oberflächenbeschaffenheit stark (Hartmann et al., 2010). Er ist aus linearen Makromolekülen wie Pili und LPS sowie Exopolysacchariden und Glycocalix-Matrix zusammengesetzt und liegt in der viskösen Phase hydratisiert vor (Costerton et al., 1987). Neben dem oberflächenassoziierten Biofilm gibt es bei *C. sakazakii* noch eine weitere Art von Biofilm, die nicht die Bakterien im Verbund betrifft, sondern die einzelne Bakterienzelle. Dieser Biofilm setzt sich zusammen aus der Bildung einer Polysaccharid-Kapsel sowie der Produktion von Exopolysacchariden (EPS), wie z.B. Colansäure (Jaradat et al., 2014). Dies dient ebenfalls der Resistenz gegen Umwelteinflüsse und erhöht die Tenazität des Bakteriums.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten, die von Hartmann *et al.* bezüglich ihrer Biofilmbildungskapazität auf abiotischen Oberflächen getestet worden sind, weisen Defekte in der Zellulosebiosynthese (BF12), im Bereich der Flagellenstruktur (BF2, BF5, BF13) oder in der Atmungskette und des Lactatstoffwechsels auf (BF1, BF8, BF9). Außerdem codiert bei einer Mutante das unterbrochene Gen für die P-Typ ATPase im Magnesiumtransport (BF17) und bei drei weiteren Stämmen konnte dem Produkt des unterbrochenen Gens noch keine Funktion zugeordnet werden (BF4, BF14, BF15).

Gene, die für die Zellulosesynthese, aber auch für die Synthese und Struktur von Flagellen codieren, scheinen in der Biofilmformation von *Cronobacter* spp. von Bedeutung zu sein, da bei diesen Transposoninsertionsmutanten die Biofilmbildung signifikant reduziert war. Außerdem führt eine Insertionsmutation in diversen hypothetischen Proteinen zu einer Änderung in der Quantität und Qualität der Biofilm-Ausbildung. Sind essentielle Zellfunktionen wie Energieproduktion und Zellteilung gestört, sind die Stämme quasi nicht in der Lage, Biofilm auszubilden (Hartmann et al., 2010). Hartmann *et al.* untersuchten einige dieser Mutanten auch auf ihre Adhäsionsfähigkeit an Caco-2-Darmepithelzellen. Es zeigte sich, dass die Zellulose-Bildung keinen Einfluss auf die Adhärenz hat, allerdings strukturell intakte Flagellen sowie die noch nicht näher identifizierten, hypothetischen Proteine von ESA_00281 (BF14) und ESA_00282 (BF15) eine wichtige Rolle spielen.

Um herauszufinden, inwiefern die Fähigkeit zur Biofilmbildung in Zusammenhang mit der Virulenz steht – insbesondere mit der Fähigkeit an eukaryotische Zellen zu adhären, aber auch in sie einzudringen und in ihnen zu persistieren und zu proliferieren – wurden in dieser Arbeit die oben genannten Transposoninsertionsmutanten weiterführend untersucht. Zusätzlich zu den Caco-2-Darmepithelzellen erfolgte ein Screening in Zellkultursystemen mit RAW-264.7-Makrophagen sowie HBMEC-Zellen (Modell der Bluthirnschranke). Außerdem wurde nicht nur die Adhäsionsfähigkeit, sondern auch die Invasion in die eukaryotische Zelle sowie die intrazelluläre Persistenz bzw. die intrazelluläre Vermehrung nach sieben Stunden überprüft.

Um vorab auszuschließen, dass die Mutation auch das allgemeine Bakterienwachstum einen Einfluss hat, wurde zunächst die Überprüfung des Wachstums in LB-Vollmedium durchgeführt. Dies zeigte, dass fast alle Biofilmmutanten wildtypisch wachsen. Lediglich der BF1-Stamm mit Mutation

im *ftsK*-Gen, das für eine DNA-Translokase codiert, die an der Transkription beteiligt ist, erreichte früher die stationäre Phase und bildete weiße Zellaggregate aus. Die beiden noch nicht näher charakterisierten Mutanten BF14 und BF15, welche durch die besondere Konformation ihres Biofilms aufgefallen waren, wichen durch eine deutlich längere lag-Phase vom Wildtyp ab. Die Stämme BF13 und BF17 erreichten eine höhere optische Dichte als *C. sakazakii* ES5.

Im Gentamycin-Assay (Gentamycin-Protection-Assay) bestätigte sich das Ergebnis von Hartmann *et al.*, dass die Zellulose-Biosynthese keinen Einfluss auf die Adhärenz an Caco-2-Zellen hat. Die Transposoninsertionsmutante BF12, die ihre Mutation im *bcsA*-Gen trägt, das für die katalytische Untereinheit der Zellulose-Synthase (Protein A) codiert und damit essentiell für die Zellulosesynthese ist, zeigte lediglich bei der Invasion in RAW-264.7-Zellen mit 68% eine geringe Attenuation. Adhäsion und Proliferation bei RAW-264.7-Zellen und sämtliche Zeitpunkte bei Caco-2- und HBMEC-Zellen waren wildtypisch. Auch bei der Mutante BF16, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden konnte, fand die Transposoninsertion im Bereich des Zellulose-Biosynthese Genclusters statt, und zwar im Gen *bcsC*. *BcsC* codiert wie *bcsA* für die Zellulose-Synthase. Die BF16-Mutante zeigt zwar bei der Caco-2- und HBMEC-Zelllinie mit 42% bzw. 34,5% verminderte Adhäsionsraten, die Invasion ist aber in allen drei Zellkultursystemen wildtypisch.

Die Transposoninsertionsmutanten BF14 und BF15 waren bei der Adhäsion an Caco-2-Zellen wie bereits bei Hartmann *et al.* um ca. 50% vermindert. In den Zellkulturversuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass auch die Invasion in Caco-2-Zellen, die Adhäsion und Invasion bei RAW-264.7 sowie die Adhäsion an HBMEC-Zellen deutlich reduziert waren. Die intrazelluläre Proliferation in Caco-2- und RAW-264.7-Zellen war aber wildtypisch oder leicht erhöht. Bei den HBMEC-Zellen war dagegen das Invasionspotential im Vergleich zum Wildtyp erhöht, die intrazelluläre Proliferation leicht vermindert. Teilweise zeigten die beiden Mutanten ein ähnliches Verhalten wie die *ompA*-Deletionsmutante, die auf Grund des bekannten Effekts des OmpA-Proteins auf die Virulenz von *C. sakazakii* als Positivkontrolle in den Assays mituntersucht wurde. Diese Daten unterstützen wie auch schon von Hartmann *et al.* vermutet, die Hypothese, dass es sich bei dem hypothetischen Protein ESA_00281 bzw. ESA_00282 um ein Oberflächenprotein mit Funktion bezüglich Adhäsion und, wie hier gezeigt worden ist, auch bei der Invasion in eukaryotische Zellen handeln könnte.

Die Transposonmutante BF1, die beim Wachstum durch das frühe Erreichen der stationären Phase und die Ausbildung der weißen Aggregate auffiel, gehört zu jenen Mutanten, bei welchen der Zellzyklus beeinträchtigt ist. Sichtbar wird dies bereits beim vergleichsweise schwachen Wachstum auf LB-Festmedium. *FtsK* ist bei *E. coli* als *cell-division*-Gen bekannt und codiert für die DNA-segregation ATPase FtsK/SpoIIIE. Es handelt sich dabei um eine membrangebundene ATPase, die die DNA in eine der zwei Tochterzellen transportiert oder, wie bei *Bacillus subtilis* gezeigt, in die Vosporen (Burton et al., 2007). In den Gentamycin-Assays war die BF1-Mutante bei allen Zelllinien in der Adhäsion und vor allem in der Invasion attenuiert. Das intrazelluläre Überleben und die Proliferation waren interessanterweise nicht vermindert.

Eine weitere auffällige Transposoninsertionsmutante ist BF4. Die Insertion betrifft hier das *wzyC*-Gen, das für die putative O-Antigen-Ligase der RfaL-Region codiert, die bei Gram-negativen Bakterien wie z.B. *E. coli* für die Lipid-A-Core-O-Antigen-Ligase und verwandte Enzyme codiert und somit essentiell für die Synthese des O-Antigens ist. Das O-Antigen ist Teil des LPS, das bei Gram-negativen Bakterien als Bestandteil der Zellwand hoch immunogen wirkt und als Virulenzfaktor diskutiert wird. Schwizer *et al.* haben die BF4-Mutante im Rahmen ihrer Serumresistenz-Studie untersucht und eine signifikant geringere Überlebensrate der Mutante im Blut im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Schwizer et al., 2013). Bei *S. Typhimurium* und *Proteus mirabilis* wurde ein Zusammenhang des LPS mit der Motilität der Bakterien, vor allem Swarming, aber auch Swimming, nachgewiesen (Morgenstein et al., 2010). BF4 verhielt sich in den durchgeführten Motility-Assay im Swimming genauso unbeständig wie der Wildtyp. Um den Einfluss von LPS auf die Motilität bei *Cronobacter* spp. zu überprüfen, müsste das Gen bei einem typisch motilen Stamm, wie z.B. *C. turicensis* 3032, deletiert und erneut untersucht werden. Im Gentamycin-Assay variierte BF4 je nach Zelllinien: Während in Caco-2-Darmepithelzellen vor allem die mit 13% schlechte Adhäsion auffiel, war bei den RAW-264.7- und HBMEC-Zellen vor allem die niedrige intrazelluläre Proliferationsrate auffällig. Es wurde publiziert, dass es einen Zusammenhang zwischen LPS und der Störung von natürlichen Gewebebarrieren, vor allem der Blut-Darm-Schranke, aber auch der Blut-Hirn-Schranke, gibt (Townsend et al., 2007a; Townsend et al., 2007b). Dies könnte eine Ursache für die verringerte Adhäsion und Invasion bei Caco-2- und HBMEC-Zellen sein. Da es sich bei Makrophagen um primär phagozytierende

Zellen handelt, die die Bakterien aktiv aufnehmen, ist hier der Mechanismus von Adhäsion und Invasion anders, was die hohe Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der Mutante in dieser Zelllinie erklären könnte. Die durch Schwizer *et al.* festgestellten Serumresistenz könnte mit der verminderten Proliferationsrate in den RAW-264.7-Zellen zusammenhängen, da *C. sakazakii* im Blut intrazellulär in den Makrophagen persistiert. Zu klären bleibt, in wie weit das LPS bei der intrazellulären Persistenz und Proliferation – vor allem in Makrophagen und HBMEC-Zellen – eine Rolle spielt, da hier der Wert der O-Antigen-Ligase-Mutante BF4 im Vergleich zu den anderen Stämmen mit 73,5% bzw. 24% überraschend niedrig ist. LPS ist ein Bestandteil des Biofilms, der Bakterien neben dem Schutz vor Umwelteinflüssen wie niedrigerem pH-Wert, auch die Möglichkeit bietet, Nährstoffe anzusammeln und somit eine adäquate Substratversorgung sicherzustellen. Deshalb könnte es sein, dass die O-Antigen-Ligase-Mutante aufgrund geringerer Säureresistenz und Nährstoffmangel in ihrer intrazellulären Persistenz und Proliferation reduziert ist.

Bei der BF8-Mutante wird durch das Transposon das *cyoD*-Gen unterbrochen. Neben den BF1- und BF9-Stämmen ist sie eine der Mutanten, bei denen das Transposon ein Gen unterbricht, das für den Zellzyklus essentiell ist. *CyoD* codiert für das Cytochrom-O-Ubiquinol-Oxidase-Protein, eine C-Oxidase, die als Enzym der oxidativen Phosphorylierung, also der Atmungskette, fungiert. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Membranprotein um eine an der Subunit IV beteiligte terminale Häm-Kuper-Oxidase handelt (Saiki *et al.*, 1996). Wie für die BF1- und BF9-Mutanten zeigte Hartmann *et al.* auch für diese Zellzyklus-Mutante, dass die Biofilmbildung fast vollständig fehlte. Interessanteweise ist im Gentamycin-Assay lediglich die Adhäsion an die RAW-264.7-Zellen mit 71,5% etwas vermindert, die Invasion und die intrazelluläre Proliferation sind in sämtlichen Zelllinien wildtypisch. Auch bei der BF9-Mutante, deren unterbrochenes Gen für die Acetolaktat-Synthase codiert, ist, im Gegensatz zur Biofilmbildung, die Virulenz im Gentamycin-Assay nicht massiv vermindert. Lediglich die Adhäsion an HBMEC- und die intrazelluläre Proliferation in Caco-2-Zellen ist mit 40,5% bzw. 55,5% deutlich vermindert. Alle anderen Werte liegen über 70% des Wildtyp-Wertes. Es fällt jedoch auf, dass die intrazelluläre Proliferation in allen drei Zelllinien zumindest leicht vermindert ist. Die Acetolaktat-Synthase setzt Pyruvat zu Acetolaktat um und spielt daher im Intermediärstoffwechsel eine wichtig Rolle, insbesondere bei der Synthese der

Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, womit die leichte intrazelluläre Attenuation erklärt werden könnte.

Das unterbrochene Gen *mgtB* der Transposoninsertionsmutante BF17 codiert zusammen mit *mgtA* für die induzierbare P-Typ ATPase, die in *S. Typhimurium* und *E. coli* bereits näher charakterisiert wurde (Hmiel et al., 1989; Snavely et al., 1989). Neben dieser Mg^{2+} -transportierenden ATPase gibt es bei Gram-negativen Bakterien einen weiteren Magnesium-Transporter und zwar den konstitutiven CorA Mg^{2+} -Transporter, der als primäres Influxsystem gesehen wird. Als drittes Transportsystem wird bei manchen Gram-negativen Bakterien *mgtE* diskutiert. Bei *Aeromonas hydrophilia* konnte nachgewiesen werden, dass *mgtE* eine Rolle in der Adhärenz spielt, da nach Unterbrechung des Gens die Adhäsion an HEp-2-Zellen um über 50% vermindert war (Merino et al., 2001). Dies könnte bedeuten, dass es sich doch um einen noch nicht näher charakterisierten Virulenzfaktor handelt und der Magnesium-Transport nur eine Nebeneigenschaft ist, oder aber dass der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Flagellenfunktion zu einer Änderung der Motilität führt, was wiederum ein geringeres Invasionspotential erklären könnte. Da auch in *C. sakazakii*, wie auch in *E. coli* und *S. Typhimurium*, neben der induzierbaren P-Typ-ATPase das Gencluster für das konstitutive CorA Mg^{2+} -Transportsystem identifiziert wurde, wäre es möglich, dass in diesen *Enterobacteriaceae* ebenfalls *mgtA* bzw. *mgtB* bezüglich der Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen eine Rolle spielen. Die Untersuchung der BF17-Mutante im Gentamycin-Assay zeigte jedoch, dass zwar die Adhäsion und Invasion in RAW-264.7-Zellen mit 34% bzw. 62,5% vermindert war, sowie die intrazelluläre Proliferation in Caco-2-Zellen (59%), alle anderen Werte waren aber wildtypisch oder leicht erhöht.

Bei den drei verbliebenen Biofilm-Mutanten BF2, BF5 und BF13 handelt es sich um Flagellenmutanten. Der Stamm BF2 mit Mutation im putativen *flhE*-Gen des *flhBAE*-Operons der *Enterobacteriaceae* bildet wildtypische Flagellen aus und zeigte im Zellkulturassay zwar Defizite, aber im Gegensatz zu den beiden anderen Flagellenmutanten BF5 und BF13 keine vollständige Attenuation. Der BF5-Stamm hat kurze, brüchige Flagellen und bei der BF13-Mutante sind keine Flagellen vorhanden. Bei BF5 inserierte das Transposon im *fliD*-Gen, das für das Flagellar-Capping Protein FliD codiert und bei der aflagellaten BF13-Mutante codiert das unterbrochene Gen für die Peptidoglycanhydrolase FlgJ. Die Ergebnisse der drei Stämme wiesen auf eine besondere Relevanz des Flagellums

in Bezug auf die Kolonisation der Wirtszelle hin, weshalb diese Mutanten näher charakterisiert wurden und in Kapitel 2.1 diskutiert werden.

1.2. Serumresistenz als Pathogenitätsmerkmal

Die Serumresistenz ist der Schlüsselmechanismus, der es Bakterien ermöglicht, eine systemische Infektion auszulösen, da hierfür die Fähigkeit im Blut zu Überleben und sich zu vermehren essentiell ist. Es ist daher von besonderem Interesse, Gene zu identifizieren, die für diejenigen Virulenzfaktoren codieren, die *C. sakazakii* Bakteriämie ermöglichen. In der Serumresistenz-Studie von Schwizer *et al.* konnten zehn Stämme identifiziert werden, die gegenüber dem bakterioziden Effekt des Serums signifikant empfindlicher waren. Zwei dieser Stämme wurden ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Bei diesen beiden Transposoninsertionsmutanten liegt die Mutation im Bereich der Transkription, das Wachstum in LB-Vollmedium ist dabei aber wildtypisch.

Bei *C. sakazakii* ES5::Tn5 MTP 51_C4 codiert das unterbrochene Gen für das hypothetische Protein Fructose-Repressor FruR. Das Protein FruR ist auch unter der Bezeichnung Cra (*catabolite repressor/activator*) bekannt, reguliert den Kohlenhydrat- und Energiehaushalt bei Darmbakterien (Saier and Ramseier, 1996) und spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Bildung von Biofilm. Bei *E. coli* z.B. kommt es durch die Mutation im *cra*-Gen zu einer um 50% reduzierten Biofilmbildung (Reshamwala and Noronha, 2011). Cra gehört zu den Transkriptions-Regulations-Proteinen der LacI-GalR-Familie und beeinflusst neben den oben genannten Eigenschaften noch weitere Mechanismen. Unter anderem wird es als Virulenzfaktor bei *Enterobacteriaceae* diskutiert (Allen et al., 2000; Gore and Payne, 2010). Da in den Infektionsversuchen dieser Arbeit die Adhäsion und Invasion in Caco-2- und vor allem in RAW-264.7-Zellen deutlich vermindert war, könnte Cra auch bei *C. sakazakii* als Virulenzfaktor von Bedeutung sein. Die intrazelluläre Proliferation war hingegen gesteigert. In HBMEC-Zellen ist nur die Invasion mit knapp 80% vermindert, die Adhäsion und die intrazelluläre Proliferation sind wildtypisch.

Bei der zweiten untersuchten Serummutante *C. sakazakii* ES5::Tn5 MTP 51_C6, befindet sich die Insertion in dem *fadR*-Gen, das für ein Transkriptionsregulations-Protein der GntR-Familie codiert. Die WHTH (*winged helix-turn-helix*) GntR-Region wurde nach dem Repressor des Gluconat-Operons bei *B. subtilis* benannt (Haydon and Guest, 1991). Sie kommt in diversen

Bakterien vor und codiert für eine Vielzahl von Regulatorproteinen, unter anderem FadR, das in *E. coli* näher charakterisiert werden konnte (van Aalten et al., 2000). Diese Regulator-Proteine kontrollieren verschiedenste biologische Vorgänge, und zwar metabolischer Art, wie z.B. den Fettsäuren-Metabolismus (Campbell and Cronan, 2001), aber auch solche im Bereich des Wachstums, der Proliferation und des Überlebens unter Stressbedingungen. Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass die Mutation im putativen *fadR*-Gen bei *C. sakazakii* zu interessanten Effekten bezüglich der Virulenz in eukaryotischen Zellen führte: Im Gentamycin-Assay waren bei dem 51_C6-Stamm Defekte in allen drei Zelllinien zu beobachten: In den Caco-2-Zellen war die Adhäsion und Invasion um fast 60% im Vergleich zum Wildtyp vermindert, in den RAW-264.7-Zellen sogar um über 75%. Bei der MTP 51_C6-Mutante war im Gegensatz zu MTP 51_C4 auch die Adhäsion und Invasion bei der HBMEC-Zelllinie mit 12% bzw. 30% stark vermindert. Die intrazelluläre Proliferation war in den HBMEC-Zellen fast wildtypisch, in Caco-2- und RAW-264.7 im Vergleich zum Wildtyp extrem erhöht.

Die deutlich verminderten Adhäsions- und Invasionswerte in der RAW-264.7-Zelllinie beider Mutanten, sowie die bekannte geringe Serumresistenz, lassen darauf schließen, dass beide Gene essentiell für das Überleben im Blut und damit für die Entwicklung einer Septikämie sind. Die Attenuation in der Darmzelllinie und bei MTP 51_C6-Mutante auch in den HBMEC-Zellen, weisen darauf hin, dass es sich bei den beiden Proteinen, dem Fructose Repressor FruR (ESA_03258) und dem putativen Transkriptionsregulator FadR (ESA_04029), um potentielle Virulenzfaktoren von *C. sakazakii* ES5 handeln könnte. Für die Verifizierung dieser Annahme stünde zunächst die Komplementierung der beiden Transposoninsertionsmutanten an. Darüber hinaus wäre die Untersuchung weiterer Serumresistenz-Mutanten im Infektionsversuch interessant.

1.3. Pigmentierung und ihre Funktion bei *C. sakazakii* ES5

Bei den hier untersuchten Pigmentmutanten ist primär die Carotinoid-Biosynthese und damit zusammenhängend die Energieproduktion und -umwandlung von der Transposoninsertion betroffen. Allerdings sind auch in dieser Mutantengruppe einzelne Stämme vertreten, deren Zellwand- oder Zellmembrankomponenten beziehungsweise der Zellzyklus durch die Insertion beeinträchtigt sind. Bei der Mutante 89_1 codiert das unterbrochene Gen für ein hypothetisches Protein, das

ortholog zum ribosomalen Reifungsfaktor RimP (*ribosome maturation factor*) ist. Dieses Protein ist wichtig bei der Reifung der 30S-Untereinheit der Ribosomen und damit bei der Translation (Nord et al., 2009). Bei der 89_1-Mutante fällt in allen drei Zelllinien das signifikant verminderte Invasionspotential auf (Caco-2: 28%, RAW-264.7: 5,5%, HBMEC: 8,5%), sowie die ebenfalls verminderte Adhäsion (v.a. in den Makrophagenzellen). Da die Translation für alle Proteine essentiell ist, also auch für die Virulenzfaktoren, wäre es möglich, dass dieser Reifungsfaktor auch bei der Virulenz indirekt eine Rolle spielt. Das intrazelluläre Überleben in eukaryotischen Zellen ist dagegen nicht beeinträchtigt: In allen drei Zelllinien zeigt dieser Stamm eine im Vergleich zum ES5 Wildtyp erhöhte Proliferation.

Bei dem Stamm 67_1 ist eine Zellmembrankomponente von der Transposoninsertion betroffen, und zwar das putative Membran-Protein IgaA. IgaA, das *intracellular growth attenuator protein A*, steht bei *S. Typhimurium* im Zusammenhang mit dem Rcs *Regulatory System*, welches bei der small-RNA-Synthese, der Kapselprotein-Synthese und der Biofilmbildung beteiligt ist (Cano et al., 2002). Darüber hinaus wurde auch ein Zusammenhang mit der Motilität der Bakterien, und zwar über die Beeinflussung des Flagellen-Operon *flhDC*, festgestellt (Majdalani and Gottesman, 2005). Erwähnenswert ist die bei der 67_1-Mutante verminderte Adhäsion und Invasion in allen drei Zelllinien (in Caco2- und RAW-264.7-Zellen um je ca. 75% und in HBMEC um mehr als 65% vermindert) und die dagegen in allen Zelllinien erhöhte intrazelluläre Proliferationsrate. In stärkerer Ausprägung kommt dieses Verhalten auch bei den Flagellenmutanten vor, deshalb wäre es von Interesse zu überprüfen, ob die Motilität auch bei *C. sakazakii* ES5 durch das Rcs-Regulator-System beeinflusst wird. Falls die 67_1-Mutante jedoch wildtypische Motilität zeigen würde, könnte das unterbrochene Gen für einen noch nicht näher charakterisierten Virulenzfaktor codieren.

Alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten Mutanten aus der Pigmentstudie können in die Bereiche des Intermediärstoffwechsels, der Carotinoidsynthese und des Energiestoffwechsels einordnet werden. An folgenden wichtigen Stoffwechselwegen sind die Enzyme beteiligt, für die die durch Transposoninsertion unterbrochene Gene codieren (Abb. 40-41; Tab. 17): Citratzyklus (Stämme 79_1, 31_1, 69_1, 68_1), Lysin-Degradation (Stämme 69_1, 31_1), Carotinoid-Biosynthese (Stämme 76_1, 38_1, 39_1, 82_2, 2_1, 1_4,

3_1) und zusätzlich über die Vorstufe der Terpenoid-Backbone-Biosynthese die Mutante 24_2, Kohlenstoff-Metabolismus (Mutanten 79_1, 31_1, 69_1, 68_1), Glycolyse und Glucogenese (Stamm 68_1), Pyruvat-Metabolismus (Mutanten 68_1, 79_1), Methan-Metabolismus sowie Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus (79_1-Mutante).

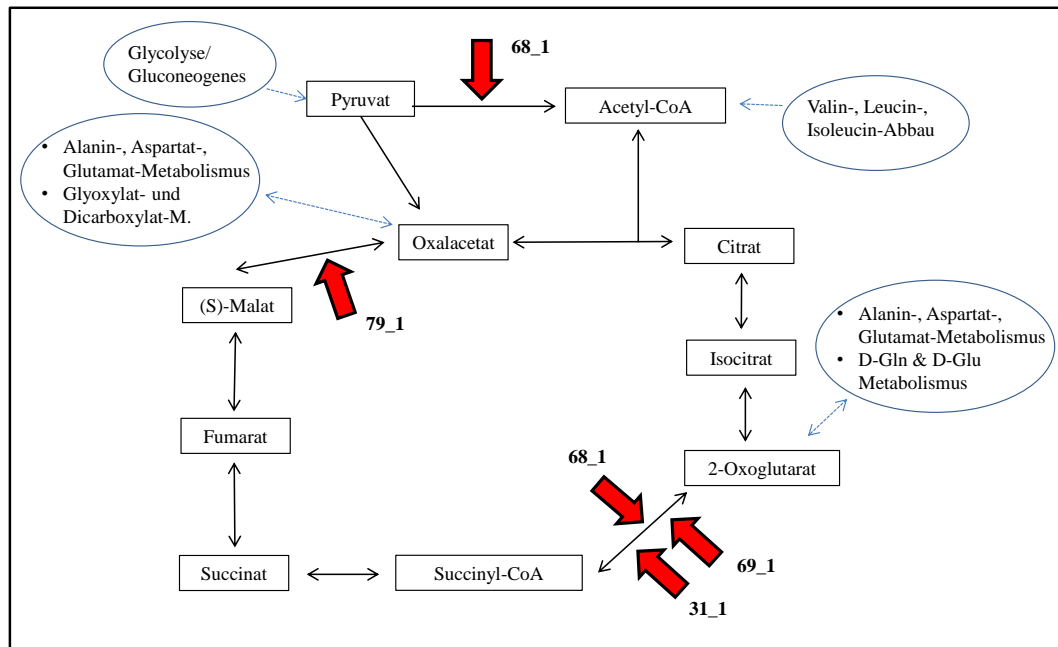


Abb. 40: Citratzyklus bei *C. sakazakii* BAA-894. Die roten Pfeile weisen auf diejenigen Reaktionsschritte hin, in denen *C. sakazakii* ES5-Mutanten durch die Transposoninsertion beeinträchtigt sind (modifiziert nach KEGG).

Der Einfluss der Mutation auf essentielle Zellfunktionen spiegelt sich bereits bei einigen Mutanten in einem veränderten Wachstumsverhalten wieder: Die Stämme 69_1, 31_1 und 79_1 kommen deutlich früher in die stationäre Phase und die Mutanten 2_1, 3_1, 24_2, 38_1 und 39_1 erreichen nach zehn Stunden eine höhere optische Dichte als der Wildtyp. Die Mutante 68_1 war in ihrem Wachstum in Vollmedium so stark vermindert, dass der Stamm von den Infektionsversuchen ausgeschlossen wurde.

In den Infektionsversuchen zeigte sich, dass die Mutation die Bakterien in ihrer Kolonisationsfähigkeit stark beeinträchtigt. Am auffälligsten war es in der RAW-264.7-Zelllinie: Keine der Pigmentmutanten erreichte auch nur die Hälfte des Wildtyp-Wertes in Adhäsion und Invasion. Intrazellulär vermehren sich dagegen alle Pigmentmutanten deutlich besser als der Wildtyp. Selbst die Beeinträchtigung in den essentiellen Stoffwechselwegen konnte also intrazellulär kompensiert werden. Es ist somit anzunehmen, dass *C. sakazakii* ES5 in der Lage ist, intrazellulär andere C-Quellen zu nutzen bzw. zwischen den verschiedenen

Stoffwechselwegen zu wechseln, wodurch die vorhandenen Defekte der untersuchten Mutanten unauffällig werden.

Mit besonders niedrigen Adhäsions- und Invasionswerten fiel in allen drei Zelllinien der Stamm 31_1 auf, dessen unterbrochenes Gen für die Dihydrolipoamid-Succinyltransferase codiert, die unter anderem die Reaktion von Succinyl-CoA zu CoA katalysiert. Ortholog ist dazu der Pyruvat/2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, die Untereinheit E3. Diese Reaktion ist für eine Reihe von Stoffwechselwegen wichtig (s.o.), was das frühe Erreichen der stationären Phase im Wachstum der Mutante sowie die Defizite in der Kolonisierung der eukaryotischen Zellen erklärt. Ganz ähnlich ist es bei der Transposoninsertionsmutante 69_1, bei der das Gen *sucA* unterbrochen ist. Dieses Gen codiert für die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E1-Komponente, die die dehydrierende Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA im Citratzyklus katalysiert sowie von α -Keto adipat zu Glutaryl-CoA im Lysin-Abbaupfad. Die Mutation im Stamm 69_1 trifft das Operon für denselben Enzymkomplex (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex) wie 31_1 und lieferte ähnliche Ergebnisse bezüglich der Kolonisationsfähigkeit. Bis auf den Adhäsionswert an HBMEC-Zellen, fielen alle Adhäsions- und Invasions-Werte zwar doppelt so hoch aus wie bei 31_1, sie waren aber im Vergleich zum Wildtyp immer noch als deutlich vermindert einzustufen. Bei der 79_1-Mutante, bei der die Mutation das Fehlen des Enzyms Malat/Lactat-Dehydrogenase verursachte, waren bis auf die Invasion in Caco-2-Zellen (68%) alle Adhäsions- und Invasionswerte um 70% vermindert. Die Transposoninsertionsmutante 68_1 ist für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase defekt, ein Enzym, das in folgenden Stoffwechselwegen beteiligt ist: Citratzyklus, Kohlenstoff-Metabolismus, Pyruvat-Metabolismus und Glycolysis/Gluconeogenese. Das führt zur massiven Beeinträchtigung des allgemeinen Metabolismus des Bakteriums und manifestierte sich schon im verminderten Wachstumspotential des Stamms in Flüssigvollmedium und auf Festmedium. Aus diesem Grund wurde 68_1-Mutante von den Infektionsversuchen ausgeschlossen.

Die Mutanten, bei denen die Carotinoidbiosynthese durch Transposoninsertion betroffen war, waren im Infektionsversuch im Allgemeinen weniger stark beeinträchtigt. Am deutlichsten war der Effekt noch bei den Transposonmutanten 24_2 sowie 38_1 und 76_1. Die Stämme 38_1 und 76_1 mit der Transposoninsertion im gleichen Gen, aber an unterschiedlichen Stellen,

verhielten sich in der Caco-2-Zelllinie gleich (Adhäsion ca. 30%, Invasion ca. 70%). In den RAW-264.7-Zellen waren dagegen Adhäsion und Invasion und in den HBMEC-Zellen die Invasion von der 38_1-Mutante weniger stark attenuiert. Der Stamm 24_2 trägt die Mutation in einem Bereich, der für die putative Geranylgeranyl-Diphosphat-Synthase des Typs II codiert, ein Enzym, das in die Carotinoid-Synthese über die Terpenoid-Backbone-Synthese involviert ist. Somit wird die Carotinoidsynthese von Beginn an blockiert. Der Stamm 24_2 erreicht bei der Invasion in Caco-2-Zellen 75% des Wildtypwertes, alle anderen Adhäsions- und Invasionswerte sind um ca. 60% reduziert.

Die durch Transposoninsertion unterbrochenen Gene der Stämme 82_2, 39_1, 2_1, 3_1 und 1_4 spielen ausschließlich in der Carotinoidsynthese eine Rolle (Abb. 41; Tab. 17). In den Caco-2-Zellen sind sie nur schwach attenuiert, teilweise ist jedoch auch die Invasion in HBMEC vermindert (Kapitel V.5).

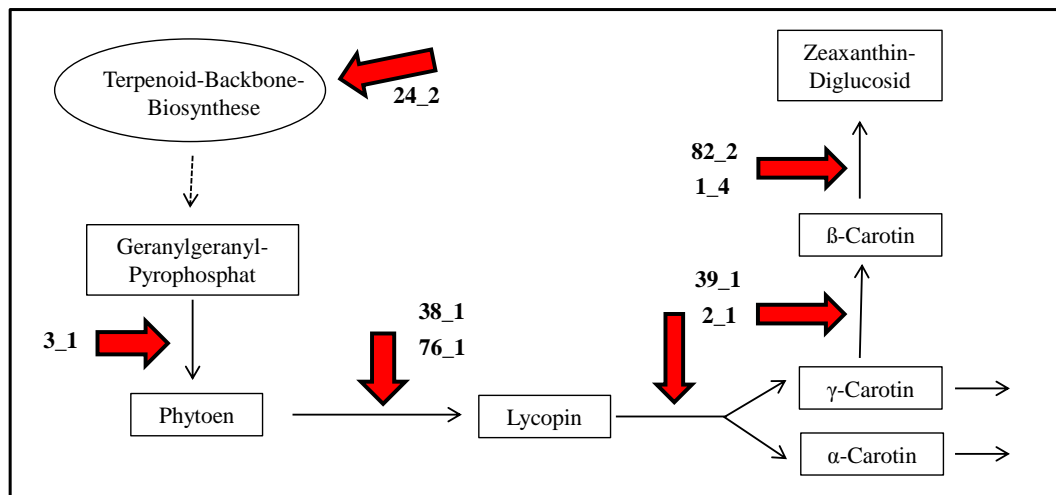


Abb. 41: Vereinfachte Darstellung der Carotinoid-Biosynthese bei *C. sakazakii* BAA-894. Die roten Pfeile symbolisieren, an welcher Stelle das bei den entsprechenden Mutanten des *C. sakazakii* ES5-Stamms durch die Insertion des Transposons die Synthese unterbrochen ist (modifiziert nach KEGG).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgängig stark verminderte Adhäsion und Invasion der nicht-pigmentierten Stämme in RAW-264.7-Zellen ein Hinweis darauf sein könnte, dass Carotinoid eine Rolle in der Serumresistenz spielt – oder, dass die Makrophagen durch Carotinoid zu einer vermehrten Aufnahme angeregt werden. Auch beim Überwinden der Bluthirnschranke könnte Pigmentierung eine Rolle spielen, da bei allen Mutanten mit Mutation im Bereich der Carotinoidsynthese die Invasion in HBMEC-Zellen vermindert war. Die Transposoninsertionsmutante 24_2, bei der die Carotinoidsynthese bereits im

ersten Syntheseschritt unterbrochen ist, war sogar um 67,5% im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

2. Funktionale Charakterisierung von potentiell neuen Virulenzfaktoren

In den Infektionsversuchen mit *C. sakazakii* ES5 stellte sich heraus, dass neben den einzelnen oben beschriebenen potentiellen Virulenzfaktoren zwei Faktoren bei der Infektion von eukaryotischen Zellen eine besondere Rolle spielen: Die Motilität der Bakterien und der Energiestoffwechsel. Aus diesem Grund wurden weiterführende Versuche mit Hilfe des colorimetrischen Verfahrens zum Kohlenstoffmetabolismus und bei ausgewählten Stämmen zur Motilität durchgeführt.

2.1. Bedeutung der Flagellen in der Virulenz von *C. sakazakii* ES5

Unter den Biofilm-Mutanten befinden sich drei Stämme, deren unterbrochene Gene für Proteine des Flagellen-Apparates codieren. Es handelt sich um die Transposoninsertionsmutanten BF2, BF5 und BF13.

Das Flagellum ist ein hoch komplexes Zellorganell, dessen Funktion über die Befähigung zur Motilität hinausgeht und bei der Virulenz diverser Bakterien eine wichtige Rolle spielt (Duan et al., 2013; Guo et al., 2014). Es wird vermutet, dass zum einen die Motilität selbst das aktive Eindringen in Zellen begünstigt, dass aber zum anderen auch bestimmte Flagellenproteine als Virulenzfaktor fungieren könnten. Es wäre denkbar, dass diese durch das Andocken an die eukaryotische Zelle direkt im Zusammenhang mit der Invasion stehen, in dem sie das Eindringen in die Wirtszelle ermöglichen. Darüber hinaus wird über das Typ-III-Sekretionssystem, das in den Flagellen von *S. Typhimurium* und *E. coli* nachgewiesen werden konnte, der pH-Wert beeinflusst, sowie Proteine – auch potentielle Virulenzfaktoren – sezerniert (Macnab, 2003). In *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* und *Bacillus thuringiensis* konnte der Zusammenhang zwischen der Sezernierung von Virulenzfaktoren, dem Typ-III Flagellensekretionssystem und der Zellinvasion gezeigt werden (Ghelardi et al., 2002; Konkel et al., 2004; Young et al., 1999). Bei *C. jejuni* wurde zusätzlich nachgewiesen, dass ein funktionierendes Typ-III Sekretionssystem und die damit verbundene Sezernierung von CiaI-Protein essentiell für das Überleben in humanen Epithelzellen ist (Buelow et al., 2011). Bei *Cronobacter* spp. ist die

Abgabe von pro-inflammatorischen Molekülen über die Flagellen bekannt (Cruz-Cordova et al., 2012). Für *C. sakazakii* konnte aber bislang keine Sezernierung potentieller Virulenzfaktoren über die Flagellen nachgewiesen werden.

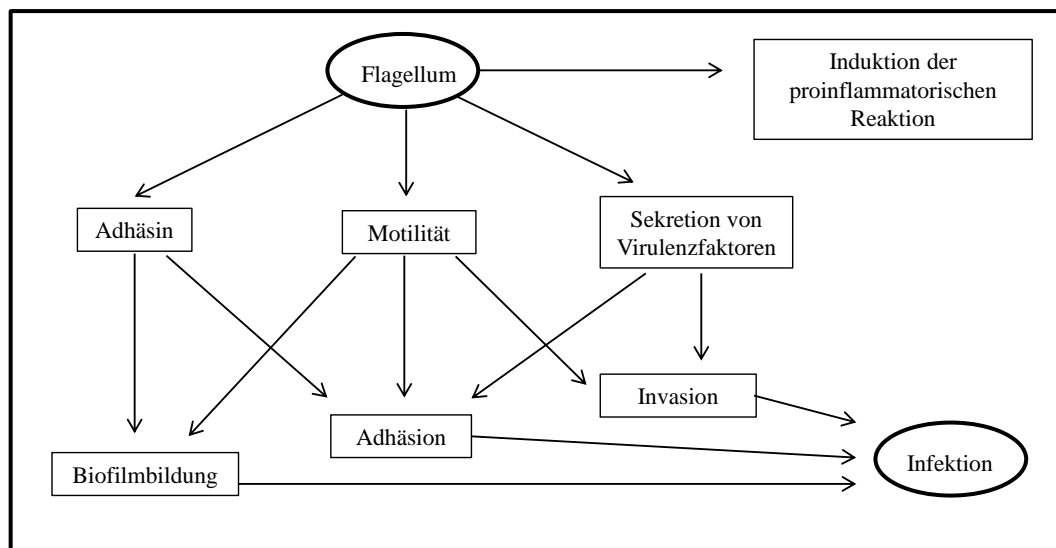


Abb. 42: Die multifunktionelle Bedeutung des Flagellums in der bakteriellen Virulenz. Die potentiell wichtigen Eigenschaften des Flagellums im Hinblick auf die Kolonisierung von Wirtszellen (Modifiziert nach Duan *et al.* (Duan et al., 2013)).

Flagellen kommen bei einer Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien vor und ermöglichen durch ihre Rotation die Fortbewegung durch Swimming in flüssigen oder halbfesten Substanzen. Der Aufbau des Flagellums wurde vor allem gut in *S. Typhimurium* und *E. coli* untersucht, man geht davon aus, dass in anderen *Enterobacteriaceae* unter anderem auch in *C. sakazakii* vergleichbare Flagellen-Strukturen vorhanden sind. Bei *C. sakazakii* orientiert sich die Charakterisierung des Flagellen-Apparates daher an den für *S. Typhimurium* und andere *Enterobacteriaceae* basierenden Erkenntnissen.

Das Flagellum setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen (Abb. 43): der basale, in den Bakterienmembranen verankerte Körper und die nach außen ragenden Komponenten Haken und Filament. Der Körper besteht aus einem durch Protonenfluss angetriebenen Motor (*proton motor force*, PMF), der das lange, gedrehte Filament rotieren lässt, und dem Flagellen-Export-Apparat (Typ-III-Flagellen-Sekretions-System). Der Haken ist ein Polymer aus FlgE-Proteinen, die im basalen Körper verankert sind. Das Filament wiederum setzt sich aus FliC-Proteinen zusammen und wird über die *hook-filament-junction*-Proteine FlgK und FlgL mit dem Haken verbunden. *Filament-capping* Protein FliD bildet das Ende des Filaments. Der Kappenkomplex besteht aus fünf FliD Untereinheiten, die eine Art Platte formen, welche über fußartige Fortsätze am Filament anhaftet (Bennett

et al., 2001; Berg, 2003; Fraser et al., 1999; Hasegawa et al., 1998; Kutsukake et al., 1994; Maki-Yonekura et al., 2003; Maki et al., 1998; Samatey et al., 2001; Yonekura et al., 2000).

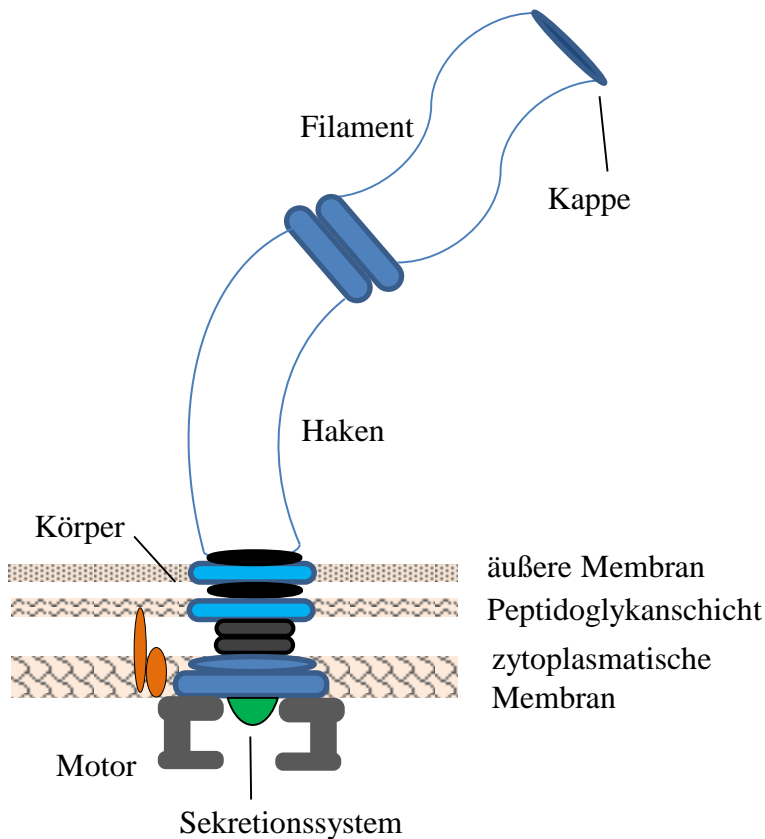


Abb. 43: Schematischer Aufbau des Flagellums (modifiziert nach KEGG).

Beim BF2-Stamm fand die Mutation im putativen *flhE*-Gen des *flhBAE*-Operons der *Enterobacteriaceae* statt. Dieses Gen codiert für das Flagellenprotein FlhE (Minamino et al., 1994). *FlhB* und *flhA* codieren für Proteine des Typ-III-Flagellen-Sekretionsapparates. FlhE dagegen ist ein periplasmatisches Protein, das aus 130 Aminosäuren besteht und im Basalkörper des Flagellums eingelagert ist. Es besitzt eine N-terminale Signalsequenz für den Export in das Periplasma via Sec-Sekretionsweg (Lee and Harshey, 2012; Minamino et al., 1994; Stafford and Hughes, 2007). Bei FlhE wird vermutet, dass es den Protonenfluss des PMF (*proton motive force*) gesteuerten Flagellen-Sekretionssystems reguliert (Lee and Harshey, 2012). Allerdings konnte dieses System für *C. sakazakii* bislang nicht verifiziert werden. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch zur pH-Wert-Änderung ergab sich im Gegensatz zu *S. Typhimurium* und *E. coli* bei BF2-

Mutante keinerlei Auffälligkeit, die auf eine Störung des Protonenflusses hingewiesen hätte (Macnab, 2003).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. sakazakii* BF2 zeigten, dass, wie bei der *S. Typhimurium flhE*-Deletionsmutante, die Flagellen wildtypisch ausgebildet sind (Hartmann et al., 2010) und bei der Betrachtung der Flüssigkultur unter dem Lichtmikroskop konnte die gleiche Motilität wie bei dem Wildtypstamm *C. sakazakii* ES5 beobachtet werden. Bei den beiden anderen Flagellen-Mutanten BF5 und BF13 dagegen ist die Flagellenbildung gestört: Der BF5-Stamm hat kurze, brüchige Flagellen und bei BF13 fehlen die Flagellen vollständig. Bei der BF5-Mutante ist das *fliD*-Gen unterbrochen, das für das *Flagellar-Capping*-Protein FliD codiert. Als das für die Flagellenausbildung essentielle Protein konnte bei *S. Typhimurium* und *E. coli* zwar Flagellin FliC identifiziert werden, FliD ist aber *in vivo* nötig, um die korrekte Anordnung der Proteinfilamente und damit deren Funktion zu gewährleisten. Sowohl bei der *fliC*- wie auch bei der *fliD*-Mutanten war weder die Fähigkeit zum Swimming noch zum Swarming gegeben (Inaba et al., 2013). Bei *Clostridium difficile* zeigten Untersuchungen, dass aflagellate und amotile Mutanten *in vitro* weniger adhärent waren, aber durchaus *in vivo* in der Lage sind, erfolgreich Darmzellen zu besiedeln. Nicht das Vorhandensein und die Funktion der Flagellen an sich scheint hier der entscheidende Faktor zu sein, sondern die strukturellen Komponenten des Flagellen-Motors. *Flagellar cap*-Protein FliD und Flagellin-FliC scheinen bei *C. difficile* also als Zelloberflächen-Adhäsine zu fungieren. Im Zellkultur Assay mit Caco-2-Zellen war nämlich die Adhäsion bei der *fliD*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermindert (Baban et al., 2013). Bei *Clostridium difficile* 630 Δ erm dagegen waren die *fliC*- und *fliD*-Mutanten zwar amotil (vollständiger Verlust der Flagellen), zeigten aber überraschenderweise *in vitro* eine gute Adhäsion an Caco-2-Zellen und eine erhöhte Virulenz im Hamster-Tiermodell (Dingle et al., 2011).

Für *Pseudomonas aeruginosa* konnte mithilfe von *fliD*- und *fliC*-Mutanten gezeigt werden, dass die Adhäsion und apikale Invasion in Caco-2-Monolayer sowie das Durchdringen der Mucin-Schicht (*Mucin penetration Assay*) bei Mutanten mit defekten Flagellen signifikant reduziert war. Bei der *fliD*-Mutante wurden sowohl im Adhäsionsassay an Caco-2-Zellen wie auch im *Mucin Penetration Assay* Werte erreicht, die nur 20% des Wildtyp-Wertes entsprachen (Hayashi et al., 2013). In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass neben *Helicobacter*

pylori auch bei den Gram-positiven Bakterien wie *Listeria monocytogenes* die Flagellen-bedingte Motilität essentiell für die Kolonisation der Darmzellen ist. (O'Neil and Marquis, 2006). FliD-Protein ist bei *H. pylori* ein wichtiger Virulenzfaktor der Kolonisation. Die *fliD*-Mutante bildet abnorme, kurze Flagellen aus, ist amotil und war im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage, im Mäusversuch die Darmmucosa zu besiedeln (Kim et al., 1999).

Bei der aflagellaten *C. sakazakii* BF13-Mutante codiert das unterbrochene Gen für die Peptidoglycanhydrolase FlgJ. Bei dem *flagellar rod assembly*-Protein FlgJ handelt es sich um ein bifunktionales Protein, das in *Salmonella* näher untersucht wurde: Der C-Terminus besitzt Muramidase-Aktivität und lysiert die Peptidoglycanschicht im Bereich der späteren Flagellen-Schwanzspitze. Der N-Terminus dagegen fungiert als Gerüst für den Schwanzaufbau und ist damit strukturell am Flagellum beteiligt. FlgJ-Protein ist essentiell für die korrekte Ausbildung des Flagellums, was den aflagellaten Phänotyp von BF13 erklärt. Das Protein wird zusammen mit anderen Proteinen, *hook type proteins* und den *hook basal body proteins*, über den Typ-III-Flagellen-Sekretionsapparat in das Periplasma sezerniert. Auch in anderen Gram-negativen Bakterien kommt *flgJ* vor, z.B. in *Vibrio* spp. und *P. aeruginosa*. Über ein Vorkommen in Gram-positiven Bakterien wurde allerdings bislang noch nichts berichtet (Hirano et al., 2001; Hirano et al., 2003).

Bei der Untersuchung der drei Flagellenmutanten im Rahmen dieser Arbeit bestätigte sich die Vermutung, dass auch bei *C. sakazakii* Flagellen eine wichtige Rolle bezüglich der Kolonisation spielen. Die *in vitro* Überprüfung der Transposoninsertionsmutanten in Vollmedium ergab, dass die BF2- und BF5-Stämme wildtypisch wachsen und der BF13-Stamm eine höhere optische Dichte als der Wildtyp erreicht. Bei der BF2-Mutante, bei der die Flagellenausbildung und -funktion nicht beeinträchtigt sind, kam es im Gentamycin-Assay zu keiner starken Reduktion in der Adhäsion an und der Invasion in die eukaryotischen Zellen. In den Caco-2-Zellen war die Invasion mit 139,5% bei wildtypischer Adhäsion sogar erhöht. Die intrazelluläre Proliferation betrug dagegen nur 72% des Wildtyps. In RAW-264.7-Zellen waren die Adhäsion mit 61,5% und die Invasion mit 86,5% vermindert, die intrazelluläre Proliferation war dagegen in den Makrophagenzellen wildtypisch. Die Adhäsion an HBMEC-Zellen war ebenfalls wildtypisch, die Invasion mit 71% und die intrazelluläre Proliferation mit 50% aber vermindert. Bei den BF5 und BF13-Stämmen zeigte sich im

Gentamycin-Assay dagegen, dass sowohl die aflagellate Mutante BF13- wie auch BF5-Mutante mit den geschädigten Flagellen in allen drei Zelllinien in Adhäsion und Invasion attenuiert waren. Die Adhäsion an Caco-2-Zellen betrug bei beiden Mutanten nur ca. 15% des Wildtyps und die Invasion war um fast 100% reduziert. Bei den RAW-264.7-Zellen war die Adhäsion der Stämme um mehr als 95% reduziert, die Invasionsfähigkeit von BF5 war mit 22,5% aber deutlich besser als bei BF13, die aflagellate Mutante erreichte nur 0,8% des Wildtypwerts. In den HBMEC-Zellen war wie in den Darmepithelzellen bei beiden Mutanten die Invasion um fast 100% vermindert, die Adhäsion mit 12,5% beim BF5-Stamm ca. doppelt so hoch wie bei BF13 mit 6,8%. Die intrazelluläre Proliferation war bei der BF13-Mutante in allen drei Zelllinien wildtypisch oder erhöht, bei der BF5-Mutante war sie dagegen in der Caco-2-Zelllinie mit 65% reduziert, in den RAW-264.7 im Vergleich zum Wildtyp erhöht und in den HBMEC-Zellen wildtypisch. Diese Ergebnisse zeigen, dass intakte Flagellen bei *C. sakazakii* für die Infektion der eukaryotischen Zellen essentiell sind. Auch der Vergleich mit dem bekannten Virulenzfaktor OmpA zeigt, welche große Bedeutung die Flagellen haben, da die Adhäsion und Invasion bei den BF5- und BF13-Stämmen meist noch stärker reduziert war, als bei der *ompA*-Deletionsmutante. Es gilt nun zu verifizieren, ob die Attenuierung primär durch die eingeschränkte Motilität der Stämme hervorgerufen wird oder auf Grund einer gestörten hypothetischen spezifischen Interaktion der intakten Flagellen mit den Wirtszellen. Auch die fehlende Sezernierung von potentiellen Virulenzfaktoren über das Typ-III-Sekretionssystem muss als Grund für die verminderte Virulenz in Betracht gezogen werden.

Um die Motilität der Stämme zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit den Stämmen BF5, BF13, BF2 und zusätzlich mit BF4 Motilitätsassays durchgeführt. Wie auch schon von Hartmann *et al.* berichtet, bestätigte sich, dass das klinische Isolat *C. sakazakii* ES5 seine Motilität in den Weichagar-Assays einstellt und daher eine diesbezügliche Untersuchung erschwert ist. Bei der Überprüfung der Motilität ergab sich jedoch, dass der Wildtyp ES5, wie auch die Mutanten BF2 und BF4, unter bestimmten Bedingungen nach 12 Stunden Inkubation teilweise Swimming in Weichagarplatten zeigten (siehe V.6.1). Bei Zusatz von Tween80 als Detergenz oder von steril-filtrierte Wildtypüberstand kam es deutlich häufiger zu diesem Effekt. Dies und die Tatsache, dass sich die Swimming-Zone nicht regelmäßig, sondern unregelmäßig nierenförmig

ausbreitete (Abb. 44), legt die Vermutung nahe, dass auch *C. sakazakii* ES5 grundsätzlich zum Swimming durch Flagellen in der Lage ist, dies aber durch bislang unbekannte Faktoren in gängigem Weichagar einstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Suppression unter speziellen Umständen wieder aufgehoben wird. Wie die Regulation der Motilität bei *C. sakazakii* abläuft, ist bislang unbekannt und muss in weiterführenden Versuchen untersucht werden. Wie oben bereits beschrieben, handelt es sich beim Flagellum um ein äußerst komplexes System, das darüber hinaus durch verschiedenste hypothetische Faktoren beeinflusst wird. Die Konstruktion weiterer Mutanten und ihre Untersuchung in verschiedenen modifizierten Motilitätsassays, sowie die Charakterisierung der Flagellen-Proteine bezüglich ihrer Funktion bei *C. sakazakii* könnten aufschlussreich sein.



Abb. 44: Swimming der BF2_Mutante in Weichagar (0,3%) mit Wildtyp-Überstand. Deutlich ist die unregelmäßige nierenförmige Ausbreitung zu erkennen, die typische „Heiligenscheinbildung“ ist nicht zu sehen (48h Inkubation bei 37°C).

2.2. Analyse des Kohlenstoffmetabolismus

Bei fakultativ intrazellulären Bakterien wie *C. sakazakii*, *E. coli* oder *S. Typhimurium* ist von besonderem Interesse wie sie in der Lage sind, nach der Infektion des Wirts ihre Zielzellen zu kolonisieren und anschließend in diesen Zellen zu überleben. Das Milieu, mit dem das Pathogen extrazellulär zurechtkommen muss, unterscheidet sich dabei im pH-Wert, Sauerstoffdruck, osmotischen Druck und den vorhandenen Substraten von den Bedingungen in der Zelle. Da die Energiegewinnung für das Bakterium sowohl extrazellulär wie auch intrazellulär essentiell ist und die Substrate variieren, wird vermutet, dass intrazelluläre Bakterien je nach Bedarf ihren Stoffwechsel umstellen können und dadurch befähigt sind, intrazellulär andere Substanzen nutzen. Die Virulenz wird demnach in hohem Maße von dem Metabolismus der Bakterien, bzw. ihrer Fähigkeit zu dessen Anpassung, beeinflusst und hängt nicht nur von den primären

Virulenzfaktoren ab, die die Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle ermöglichen. Vermutlich wird der bakterielle Metabolismus durch spezielle Faktoren gesteuert, die je nach Umgebungsbedingungen exprimiert werden (Eisenreich et al., 2010).

Der Energiestoffwechsel von Bakterien scheint somit in engem Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Kolonisierung der Wirtszellen und dem intrazellulären Überleben zu stehen und ist deshalb hinsichtlich der Virulenz interessant. Diese Vermutung wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert, da die *C. sakazakii* ES5-Mutanten mit Transposoninsertion in wichtigen Stoffwechsel-Genen im Gentamycin-Infektionsassay in Adhäsion und Invasion attenuiert waren. Aus diesem Grund wurden weiterführend *in vitro* Versuche zu der Metabolisierung definierter C-Quellen durchgeführt.

2.2.1. Speziesbesonderheiten in der Kohlenstoffmetabolisierung

Der Vergleich von den fünf hier untersuchten *C. sakazakii*-Isolaten mit zwei *C. turicensis*-Stämmen und *S. Typhimurium* ST4/74 bezüglich ihres Kohlenstoff-Metabolismus ergab interessante Unterschiede:

C-Quellen aus der Umwelt

Die ubiquitären *Cronobacter*-Stämme waren im Gegensatz zu *S. Typhimurium* in der Lage, die in der Umwelt vorkommenden C-Quellen wie D-Raffinose, Sucrose, α -Mehtyl-D-Glucosid, Arbutin, D-Arabinose, D-Cellobiose, D-Galacturonsäure, D-Xylose, Gentiobiose und Salicin zu verstoffwechseln. *S. Typhimurium* ST4/74, ein klinisches Isolat, konnte diese Substrate nicht umsetzen. Das legt die Vermutung nahe, dass *Cronobacter* evolutionär gesehen aus der Umwelt kommt, vor allem in Assoziation mit den Pflanzen, und nicht primär auf die Besiedelung von Säugetierorganismen ausgerichtet war (Jaradat et al., 2014).

Lactose

Auch bei C-Quellen, die primär in Lebensmittel vorkommen, wich *S. Typhimurium* von den untersuchten *Cronobacter* spp.-Stämmen ab. Gerade Lactose - auf Grund der Bedeutung von *C. sakazakii* in Milchprodukten eine äußerst interessante Kohlenstoffquelle - konnte *S. Typhimurium* gar nicht zur Energiegewinnung nutzen. Die *C. sakazakii*-Stämme dagegen verstoffwechselten Lactose sehr gut, ebenso wie das Lebensmittelisolat *C. turicensis* E609. Bei *C. turicensis* 3032, einem klinischen Isolat aus dem Blut eines septikämischen

Neonaten, war die Fähigkeit zur Metabolisierung von Lactose dagegen nur schwach.

Aminosäuren

Bei den Aminosäuren wichen die einzelnen *C. sakazakii*-Stämme teils deutlich voneinander und von den Vergleichsstämmen ab. Besonders bei L-Histidin, L-Isoleucin, L-Valin, sowie D-Alanin, L-Asparagin und L-Aspartat, was auf die Nutzung unterschiedlicher Stoffwechselwege hinweisen könnte.

D-Glucose-6-Phosphat

Während *S. Typhimurium* D-Glucose-6-Phosphat verstoffwechselt, wird das Substrat von *C. sakazakii* nicht umgesetzt. Dies ist ein äußerst interessantes Ergebnis, da D-Glucose-6-Phosphat ein wichtiges intrazelluläres Stoffwechselzwischenprodukt ist und bei *Enterobacteriaceae* neben Glucose und Mannose als die bevorzugte Kohlenstoffquelle angesehen wird (Gotz and Goebel, 2010). Im Gegensatz zu Glucose, für die mehrere Transporter zur Verfügung stehen, wurde in *E. coli* (EIEC), *Shigella* und *S. Typhimurium* der UhpT-Transporter als bislang einziges Transportsystem für Glucose-6-Phosphat identifiziert (Island et al., 1992). Dieses wird über ein komplexes Zwei-Komponenten-System reguliert, codiert durch das *uhpABC*-Operon (Verhamme et al., 2002). Zusammen mit der Katabolitrepression wird so die Aufnahme von Glucose-6-Phosphat blockiert, solange noch Glucose vorhanden ist.

In der Wirtszelle wird Glucose intrazellulär im Cytosol nach der Aufnahme über das GLUT- oder das natriumabhängige SGLT-Transportsystem zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust. Das so entstehende Pyruvat wird in die mitochondriale Matrix transportiert und dort durch die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA ist ein Substrat des Citratzyklus. Die synthetisierten Substanzen werden fortlaufend wieder ins Cytosol abgegeben, z.B. über den Malat-Aspartat-Shuttle. Alle entstehenden Zwischenprodukte können potentiell durch die intrazellulären Bakterien zur Energiegewinnung genutzt werden (Eisenreich et al., 2010).

C. sakazakii kann zwar *in vitro* Glucose-6-Phosphat nicht verstoffwechseln, wenn es als einzige C-Quelle zur Verfügung steht, dies bedeutet aber nicht, dass die Spezies grundsätzlich nicht zur Umsetzung von Glucose-6-Phosphat in der Lage ist. Alle humanpathogenen Bakterien sind nämlich heterotroph, das heißt sie können sich die benötigten Substanzen aus diversen ihnen zu Verfügung

stehenden Substraten synthetisieren. Außerdem handelt es sich bei *C. sakazakii* um ein intrazelluläres Bakterium, das dazu in der Lage sein müsste, seinen Metabolismus anpassen zu können (Eisenreich et al., 2010; Gotz et al., 2010; Gotz and Goebel, 2010). Es wäre also denkbar, dass *Cronobacter* spp. intrazellulär Glucose-6-Phosphat nutzen kann und die Aufnahme von Glucose-6-Phosphat ähnlichen Regulationsmechanismen wie bei *E. coli* und *S. Typhimurium* unterliegt. Aus diesem Grund wäre es hinsichtlich der Pathogenese von *C. sakazakii* interessant, einen UhpT homologen Transporter bei *C. sakazakii* zu identifizieren und diesen anhand von Deletionsmutanten zu untersuchen: Im Zellkultursystem auf die intrazelluläre Proliferation sowie mit Hilfe von [U-¹³C]- bzw. [1,2-¹³C]-markierten Glucose als C-Quellen auf den Metabolismus von Glucose-6-Phosphat. Dies könnte ein Hinweis auf eine besondere Anpassung an das Überleben im Säugetierorganismus darstellen.

2.2.2. Charakterisierung des Kohlenstoffmetabolismus von *C. sakazakii* ES5 an Hand der Transposoninsertionsmutanten

Von den in dieser Arbeit untersuchten Mutanten ist ein großer Teil den orthologen COG-Gruppen C oder G zuzuordnen, also der Energieproduktion und -umwandlung bzw. dem Kohlenstoff-Transport und -Metabolismus. Gerade bei diesen Mutanten weicht das Metabolisierungsmuster der getesteten Kohlenstoffquellen häufig ab (Kapitel IV.7.2).

Mit am auffälligsten ist dies bei der Transposoninsertionsmutante 68_1. Der Mutante fehlt, wie oben bereits beschrieben, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, weshalb sie in einigen wichtigen Stoffwechselwegen beeinträchtigt ist (Tab. 17).

Tab. 17: Übersicht der durch die Mutation potentiell beeinträchtigten Stoffwechselwege je Mutante.

	Citrat- zyklus	Carotinoid- Biosyn- these	Carbon- Metabolis- mus	Glycolyse/ Gluconeo- genese	Pyruvat- Metabolismus	Methan- Metabolismus	Glyoxylat- & Dicarboxylat- Metabolismus	Lysin- Abbau
68_1	x		x	x	x			
69_1	x		x					x
31_1	x		x					x
79_1	x		x		x	x	x	
82_2		x						
1_4		x						
3_1		x						
2_1		x						
39_1		x						
38_1		x						
76_1		x						
24_2		x						

Über das colorimetrische Verfahren wurde überprüft, welche Kohlenstoffquellen von dem Stamm im Zeitraum von 48 Stunden metabolisiert werden können. Im Vergleich zum Wildtyp ES5 fiel auf, dass diverse C-Quellen aus Lebensmitteln, nämlich Lactulose, Turanose, Tween20, Pektin und Äpfelsäure, weniger gut zur Energiegewinnung genutzt werden konnten. Die Aminosäuren L-Glutamin und L-Serin wurden bei der 68_1-Mutante (Dihydrolipamid-Dehydrogenase) erst nach 48 Stunden verstoffwechselt. L-Asparagin, D-Alanin und Monomethylsuccinat konnten dagegen von dem Stamm 68_1 im Vergleich zum Wildtyp besser umgesetzt werden. Bei Betrachtung der C-Quellen aus dem Intermediärstoffwechsel fällt genauso wie bei den Aminosäuren auf, dass teils andere Substrate als beim Wildtyp genutzt wurden. Beispielsweise konnte 68_1 L-Asparagin besser metabolisieren, dafür war aber die Umsetzung von L-Glutamat geringer. L-Asparagin und L-Glutamat stehen im Citratzyklus über α -Ketoglutarat miteinander in Verbindung. Diese Abweichung im Metabolisierungsmuster könnte also ein Hinweis auf eine durch die Transposoninsertion verursachte Anpassungsreaktion sein. Auch bei den Stämmen 31_1, 69_1 und 79_1, deren Mutation ebenfalls für ein Enzym des Citratzyklus codiert, wurde L-Asparagin besser und L-Glutamat schlechter metabolisiert.

Dass Serin erst nach 48 Stunden von 68_1 verstoffwechselt werden konnte, könnte genauso wie die reduzierte Nutzung von Threonin im Zusammenhang damit stehen, dass das beeinträchtigte Enzym Dihydrolipamid-Dehydrogenase auch bei der Glycolyse/Gluconeogenese wichtig ist und das dort gebildete Substrat 3-Phosphoglycerat bei der Synthese von Threonin und Serin eine Rolle spielt. Die Aminosäuren L-Leucin und L-Isoleucin konnten gar nicht bzw. nur in geringem Maß umgesetzt werden. Ihre Synthese erfolgte aus Pyruvat und der Pyruvatmetabolismus ist bei der 68_1-Mutante ebenfalls von der Mutation betroffen. Eventuell könnte aufgrund der reduzierten Eigensynthese auch der Abbau dieser C-Quellen vermindert sein. Allerdings war bei den anderen Citratzyklus-Mutanten (69_1, 31_1, 79_1), deren Mutation die Glycolyse nicht betrifft, die Umsetzung von L-Threonin ebenfalls stark vermindert. Valin, aus Pyruvat stammend, wurde von allen dreien gar nicht umgesetzt, obwohl der Pyruvatmetabolismus nur beim 79_1-Stamm von der Mutation betroffen ist.

Insgesamt waren alle vier Transposoninsertionsmutanten mit Mutation im Bereich des Citratzyklus bezüglich ihres Metabolisierungsmusters auffällig. Da die

Mutation aber bei diesen Mutanten auch den allgemeinen Kohlenstoffmetabolismus selbst betrifft, könnte dies die Abweichung bei der Verstoffwechselung von C-Quellen erklären.

Ebenfalls auffällig in der biochemischen Charakterisierung war MTP 51_C4 gewesen. Das unterbrochene Gen kodiert bei dieser Mutante für den Fructose-Repressor FruR (Cra), der eine wichtige Rolle in der Regulation des Kohlenstoff- und Energiehaushalts bei Darmbakterien spielt. Methylpyruvat als wichtiges Stoffwechselsubstrat konnte von dieser Mutante nur in geringem Maße umgesetzt werden, genauso wie die Brenztraubensäure und die Oxalsäure. Auch beim Metabolisierungsmuster der Aminosäuren wich der Stamm vom Wildtyp ab: L-Valin und L-Histidin wurden von der Mutante nicht verstoffwechselt und L-Serin und L-Threonin nur schwach. D-Alanin wurde dagegen im Vergleich zum Wildtyp *C. sakazakii* ES5 besser metabolisiert (Abb. 36).

Die Flagellenmutanten BF5 und BF13 fielen bei diversen Substraten, z.B. bei α -D-Lactose und D-Alanin, durch verringerte Umsetzung auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Flagellum indirekt über Sekretion von Proteinen in Zusammenhang mit der Aufnahme und Umsetzung bestimmter Substrate steht.

Die Stämme mit Mutation in der Carotinoid-Biosynthese konnten D-Alanin und L-Ornithin besser und L-Valin und L-Histidin schlechter verstoffwechseln als der ES5-Wildtyp. Die 2_1-Mutante konnte L-Valin und L-Histidin überhaupt nicht metabolisieren und beim 3_1-Stamm war L-Asparagin negativ. Bei diesen beiden Mutanten war auch die Aufnahme von α -D-Lactose reduziert, was eine verminderte Anpassung an das Persistieren in Milch als Substrat bedeuten könnte.

3. Funktion der Lycopon- β -Cyclase in der Carotinoid-Biosynthese von *C. sakazakii* ES5

Die in dieser Arbeit durchgeführte erfolgreiche Komplementierung der morphologisch auffälligen Transposoninsertionsmutante 2_1 ermöglicht die nähere Charakterisierung von CrtY bei *C. sakazakii* ES5. Wie bei der 2_1-Mutante ist auch bei der Mutante 39_1 das entsprechende Gen ESA_00344 durch ein Transposon unterbrochen, ohne dass es jedoch zu der beim 2_1-Stamm beobachteten pink-Färbung der Kolonien kommt

Das Gen ESA_00344 ist 1.176 bp lang und befindet sich an Position 318.102-316.927 auf dem komplementären Strang des bakteriellen Chromosoms. Die Insertionsstelle des Transposons der Mutante 2_1 liegt bei Basenpaar 317.733 relativ am Anfang des Gens, während die Transposoninsertion bei der 39_1-Mutante eher am Ende des Gens, nämlich an Stelle 317.009 ist (Abb. 45). Es ist möglich, dass eine Transposoninsertion am Genende nicht zu dessen Inaktivierung führt, da die für die Translation entscheidenden Abschnitte transkribiert werden konnten, und der nach der Insertion liegende Abschnitt des Gens nicht essentiell für die Funktion des Enzyms ist. Die letzten Aminosäuren spielen häufig keine Rolle bei der Konformation und damit in der Funktionalität des Enzyms. Wenn die Gene aber wie für die Carotinoid-Biosynthese in einem Cluster organisiert sind, unterliegen sie gemeinsamer Regulation. Einige dieser Gene werden zudem zusammen transkribiert, vor allem wenn es sich um überlappende Gene wie bei *crtY* und *crtI* handelt. Dadurch betrifft die Transposoninsertion am Ende des *crtY*-Gens auch das downstream liegende Gen *crtI* (Abb. 45).

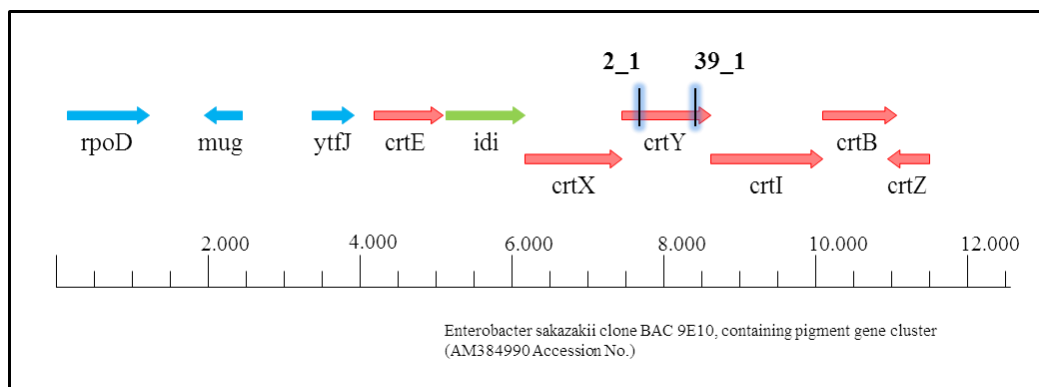


Abb. 45: Carotinoid-Biosynthese-Gencluster. Die Pfeile symbolisieren die Gene und ihre Ableserichtung im Genom. Im *crtY*-Gen sind die beiden Stellen markiert, an denen das Gen durch die Transposoninsertion bei 2_1 bzw. 39_1 unterbrochen ist.

Bei der Carotinbiosynthese entsteht zunächst aus zwei Molekülen Geranylgeranylpyrophosphat (C20) das farblose Phytoen, das zu dem hellgelben ζ -Carotin isomerisiert wird. Dieses wird zu dem orangen Neurosporin oxidiert. Neurosporin wird entweder weiter zu dem roten Lycopin oxidiert oder über β -Zyklisierung zu β -Zeacarotin, das dann zu γ -Carotin oxidiert wird. Lycopin wird über β -Cyclisierung direkt zu γ -Carotin. Das entstandene γ -Carotin wird über β -Cyclisierung zu dem dunkel-gelben β -Carotin, das zusammen mit α -Carotin das Endprodukt der Carotinbiosynthese dargestellt (Abb. 46).

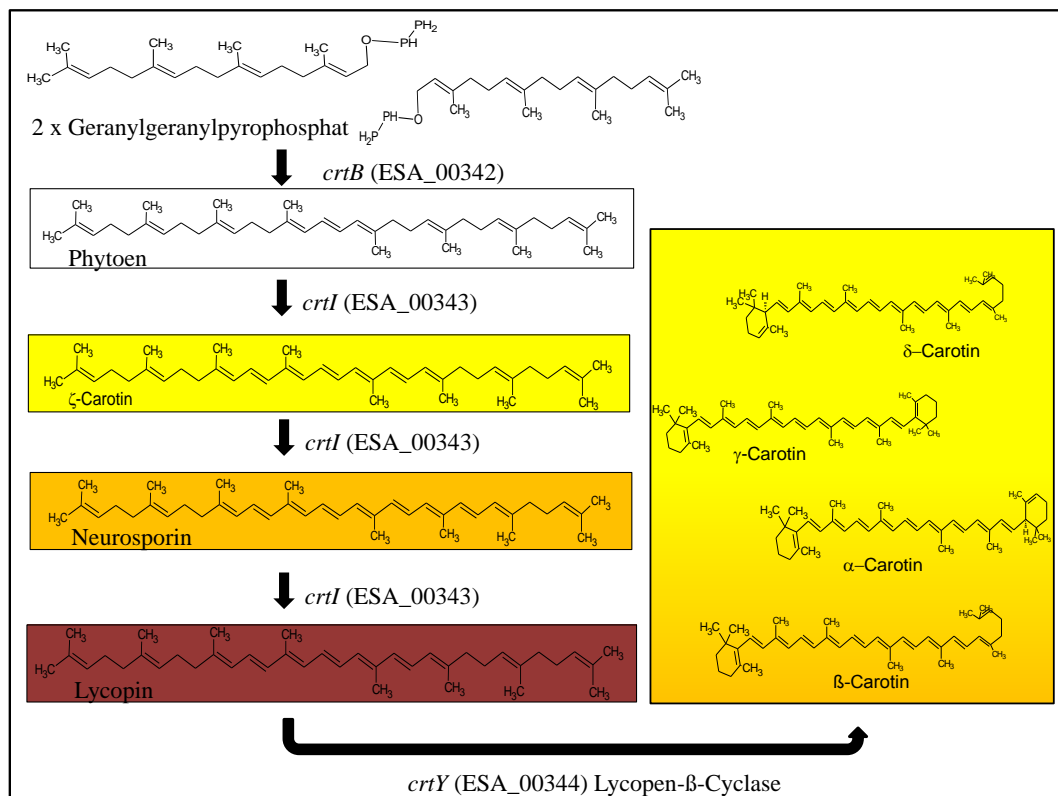


Abb. 46: Carotinoid-Biosynthese-Modell für *C. sakazakii* ES5. Die Formeln der Substrate sind in der Farbe hinterlegt, die der Färbung des Pigments entspricht. Die Gennamen neben den Pfeilen beschreiben das Gen, das für das entsprechende Enzym codiert. In Klammern steht die jeweilige Gennummer bei *C. sakazakii* BAA-894.

Das Gen *crtY* (ESA_00344) codiert für die Lycopin- β -Cyclase, die die oben beschriebenen β -Cyclisierungen katalysiert. Damit führt das Fehlen von Lycopin- β -Cyclase zu der Akkumulation von Lycopin im Cytosol der Zelle, was für die Rot-Verfärbung der Mutante 2_1 verantwortlich zu sein scheint (Kapitel V.3.3). Lycopin gehört zu den Carotinoiden und ist dunkel-rot. Es kommt vor allem in Tomaten vor, ist fettlöslich und empfindlich gegen Licht, Hitze, Sauerstoff und Säuren und fungiert als Radikalfänger.

Eine sichtbare Farbänderung, die durch eine durch ein defektes Enzym bedingte Farbstoff-Akkumulation verursacht wird, wurde bereits z.B. für *Fusarium fujikuroi* beschrieben (Prado-Cabrero et al., 2009) und scheint auch hier zu Grunde zu liegen. Die vor kurzem veröffentlichte Rekonstruktion der Carotinoid-Biosynthese von *C. sakazakii* BAA-894 in einem nicht-pigmentierten *E. coli*-Stamm zeigt die unterschiedliche Pigmentierung der *E. coli*-Mutanten abhängig von den eingefügten Genen des Carotinoid-Biosyntheseclusters (Zhang et al., 2014).

Durch die in dieser Arbeit konstruierte komplementierte *crtY*-Mutante von *C. sakazakii* ES5 konnte die Auswirkung des *crtY*-Gens auf die Pigmentierung von *C. sakazakii* ES5 eindeutig belegt werden: Während die *C. sakazakii* Mutante 2_1 mit dem pUC19-Vektor weiterhin die auffälligen pinken Kolonien auf LB-Agar ausbildete, wies die komplementierte Mutante 2_1/*crtY*⁺ die wildtypisch gelbe Pigmentierung wieder auf (Abb. 10).

Bei der Überprüfung des Wachstums in Vollmedium entsprach die Zunahme der optischen Dichte der komplementierten Mutante der des Wildtyps ES5, während die 2_1-Mutante höhere Werte erreichte. Das bedeutet, dass die Komplementierung mit pUC19-*crtY* stabil in der Bakterienzelle bleibt und zu einem wildtypischen Verhalten der Mutante führt. Die zusätzlich durchgeführte Bestimmung der CFU-Werte untermauert dies: Der 2_1/*crtY*⁺-Stamm zeigte bei jedem Messzeitpunkt im Vergleich zum Wildtyp etwas niedrigere CFU-Werte, was durch die Antibiotikazusätze als Selektionsmarker bedingt war. Der Kurvenverlauf der 2_1-Mutante unterschied sich dagegen durch eine etwas flachere log-Phase von der des Wildtyps und der komplementierten Mutante (Abb. 13).

Das Screening von *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5/pUC19-*crtY* bezüglich der Virulenz in eukaryotischen Zellen zeigte, dass die Komplementierung zwar nicht vollständig zum wildtypischen Verhalten in Zellkultursystemen führte. Allerdings wurde durchaus deutlich, dass es auf Grund der Komplementation des *crtY*-Gens mindestens zu einer Annäherung an den Wildtypstamm ES5 kommt.

In den Caco-2-Darmepithelzellen war das Invasionspotential der 2_1 Mutante um knapp 20% vermindert, bei dem komplementierten 2_1/*crtY*⁺-Stamm dagegen sogar leicht erhöht. Die intrazelluläre Proliferation der komplementierten Mutante in den Caco-2-Zellen war sowohl im Vergleich zum Wildtyp als auch zu

Transposoninsertionsmutante 2_1 erhöht. Dies könnte durch den Einfluss des *high-copy* pUC19-Vektors bedingt sein.

In den RAW-264.7-Zellen lag der Invasionswert sowie die intrazelluläre Proliferation von *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5/pUC19-*crtY* im Bereich zwischen *C. sakazakii* ES5 und ES5*crtY*::Tn5. Die *crtY*-Komplementierung führte hier nur zu einem Annähern an das wildtypische Verhalten, erreicht wurde dies allerdings in den RAW-264.7-Zellen nicht.

In den die Bluthirnschranke symbolisierenden HBMEC-Zellen war dagegen der Effekt auf die Invasion und die intrazelluläre Proliferation besonders deutlich: Während bei der Insertionsmutante 2_1 mit unterbrochenem *crtY*-Gen die Invasion um mehr als 30% und die intrazelluläre Proliferation um mehr als 40% reduziert war, erreichte die komplementierte Mutante 2_1/*crtY*⁺ höhere Werte als der Wildtyp.

Diese Ergebnisse belegen, dass das verminderte Invasionspotential bei *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5 (2_1-Mutante) in allen drei Zelllinien auf die Unterbrechung des *crtY*-Gens zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnte in einem nicht rekombinanten System verifiziert werden, dass dieses Gen bei *C. sakazakii* ES5 für die Lycopin- β -Zyklase codiert, die die Synthese von Carotinoiden aus Lycopin katalysiert.

Zu prüfen bleibt, inwieweit die Mutation die Tenazität der Stämme beeinflusst, vor allem in Bezug auf die Bestrahlung mit UV-Licht und Sauerstoffdruck. Außerdem wäre es interessant, das Pigment von *C. sakazakii* ES5, der Transposoninsertionsmutante 2_1 sowie das der komplementierten Mutante zu extrahieren, deren Spektrum zu bestimmen und zu vergleichen.

4. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen schließen, dass die Virulenz von *C. sakazakii* ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Flagellen eine Schlüsselrolle haben – sie müssen aber hinsichtlich ihrer genauen Funktion bei der Invasion eukaryotischer Zellen noch weitergehend untersucht werden: Werden bei *C. sakazakii* über das Typ-III-Flagellensekretionssystem Virulenzfaktoren sezerniert? Welcher Regulation unterliegt das Swimming bei *C. sakazakii* ES5 und ist die Motilität des Bakteriums oder die Flagellenstruktur bei Adhäsion und Invasion letztendlich entscheidend?

Weiterhin sollten die in dieser Arbeit identifizierten potentiellen Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel der putative Reifungsfaktor RimP oder die mit der Serumresistenz in Verbindung stehenden Faktoren FadR und Fructose Repressor FruR, näher untersucht werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel ergaben weitere interessante Ansatzpunkte: Besonders vielversprechend ist die fehlende *in vitro* Metabolisierung von Glucose-6-Phosphat. Die Identifizierung eines putativen Glucose-6-Phosphat-Transporters im Genom von *C. sakazakii* ES5 sowie die anschließende Konstruktion einer Deletionsmutante wären von Bedeutung. Darüber hinaus sollten Methoden etabliert werden, die es erlauben, den intrazellulären Stoffwechsel zu studieren. Eine Möglichkeit wäre die Untersuchung mit Hilfe von [U-¹³C]-markierten C-Quellen in Zellkultursystemen, z.B. über die C-isotopologue-profiling analysis (C-IPA) oder die Raman Mikrospektroskopie. Der Abgleich des extrazellulären Stoffwechsels von *C. sakazakii* mit seinem Metabolismus in der eukaryotischen Zelle könnte zu einem besseren Verständnis der Pathogenität des Bakteriums führen und eventuell die Identifizierung essentieller Virulenzmechanismen ermöglichen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Cronobacter sakazakii ist ein ubiquitäres Gram-negatives Stäbchenbakterium, das neben anderen Lebensmitteln vor allem in Milchpulver vorkommt und insbesondere bei Neonaten zu nekrotisierender Enterocolitis (NEC), Bakteriämie und Meningitis führen kann.

Trotz der umfangreichen Forschung der letzten Jahre ist nach wie vor wenig über die Pathogenese von *Cronobacter* spp. sowie potentielle Virulenzfaktoren bekannt.

Um neue Erkenntnisse über Pathogenitätsmechanismen von *C. sakazakii* zu erhalten, wurden in dieser Arbeit 28 Transposoninsertionsmutanten des klinischen Isolats *C. sakazakii* ES5 in drei unterschiedlichen Zelllinien auf ihre Fähigkeit an die eukaryotischen Zellen zu adhärieren, in sie einzudringen und in ihnen zu proliferieren, untersucht. Die inaktivierten Gene dieser Mutanten codieren für Proteine des Energiestoffwechsels, der Zellwand und des Biofilms, der Motilität der Bakterien und der Carotinoidbiosynthese. Angelehnt an den *in vivo* Infektionsweg von *C. sakazakii* - orale Infektion des Organismus, primäre lokale Infektion im Darm, systemische Infektion über die Invasion in Makrophagen und schließlich das Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke und die Infektion des Gehirns - wurden für die Studie Caco-2 Darmepithelzellen, RAW-264.7 Makrophagen-Zellen sowie HBMEC Hirnendothelzellen ausgewählt. Beim Screening aller drei Zelllinien konnte festgestellt werden, dass die Flagellenstruktur betreffende Mutationen bei *C. sakazakii* ES5 zu fast 100%iger Attenuation der Invasion der Wirtszellen führen. Dies lässt auf die Bedeutung der Flagellen als Pathogenitätsfaktor schließen. Bedingt sein könnte die Attenuierung durch die verminderte Motilität der Bakterien, durch die instabile Interaktion von Flagellen mit den eukaryotischen Zellen selbst oder möglicherweise durch die fehlende Sekretion von Virulenzfaktoren durch das Typ-III-Flagellen-Sekretionssystem. Weiterführende Untersuchungen zu der Motilität der Transposoninsertionsmutanten zeigten, dass die Flagellenfunktion bei *C. sakazakii* ES5 durch Suppression reguliert zu sein scheint, da die bei *C. sakazakii* ES5 vorhandene Hemmung des Flagellen-vermittelten Swimmings im Weichagar

z.B. unter Zugabe von steril filtriertem Überstand einer *C. sakazakii* ES5-Kultur wieder aufgehoben werden konnte.

Des Weiteren fielen zwei Mutanten mit verminderter Serumresistenz durch reduzierte Virulenz auf, sowie eine Mutante, deren unterbrochenes Gen für einen putativen Reifungsfaktor der 30S-Untereinheit der Ribosomen codiert. Bei diesen drei Mutanten könnten die inaktivierten Gene für potentielle Virulenzfaktoren codieren und sollten näher untersucht werden.

Transposonmutanten aus der orthologen Gruppe für Energiestoffwechsel zeigten ebenfalls eine verminderte Invasion. Diese Stämme hatten bei der biochemischen Charakterisierung der Metabolisierung definierter Kohlenstoffquellen bei den Aminosäuren und den Zwischenprodukten des Intermediärstoffwechsels ein vom Wildtyp ES5 abweichendes Metabolisierungsmuster. Die Unterbrechungen im Citratzyklus führten z.B. zur schwächeren Verstoffwechselung von L-Glutamat, dafür wurde L-Asparagin besser als Substrat verwertet. Somit konnte die Fähigkeit zur Anpassung durch Umstellung des Metabolismus bei *C. sakazakii* ES5 bestätigt werden.

Weiterhin ergab der Vergleich des Kohlenstoff-Metabolismus von *Cronobacter* spp. mit dem von *Salmonella enterica* sv. Typhimurium einige interessante Unterschiede: *C. sakazakii* konnte im Gegensatz zu *S. Typhimurium* eine Vielzahl in der Umwelt vorkommender C-Quellen zur Energiegewinnung nutzen, was darauf schließen lässt, dass das ubiquitäre Bakterium *Cronobacter* spp. ursprünglich mit Pflanzen assoziiert war. Glucose-6-Phosphat, ein wichtiges Stoffwechselzwischenprodukt, das bei pathogenen *Enterobacteriaceae* neben Glucose und Mannose intrazellulär als die bevorzugte Kohlenstoffquelle gilt, wurde von *C. sakazakii* dagegen *in vitro* nicht metabolisiert. Es bleibt zu klären, ob *C. sakazakii* in der Lage ist, intrazellulär seinen Stoffwechsel umzustellen und Glucose-6-Phosphat als C-Quelle zu nutzen.

C. sakazakii ist ein gelb pigmentiertes Bakterium und synthetisiert die Pigmente über Carotinoid-Biosynthese. In den Infektionsversuchen zeigte sich, dass pigmentlose Mutanten in der Invasion von RAW-264.7-Zellen attenuiert sind. In diesem Zusammenhang konnte auch festgestellt werden, dass bei der *de novo* Carotinoid-Synthese das CrtY-Protein (Lycopin- β -Cyclase) die β -Cyclisierung von Lycopin zu β -Carotin ausführt. Nach Komplementierung der *crtY*-Mutante zeigte sich erneut die wildtypische gelbe Pigmentierung der Bakterienkolonien von *C. sakazakii* ES5*crtY*::Tn5/pUC19-*crtY*, anstatt der pinken Koloniefärbung

der Mutante. Die Reduzierung der Invasion in HBMEC-Zellen um mehr als 30% konnte durch die Komplementation des *crtY*-Gens aufgehoben werden: die konstitutive Expression des Gens führte zu einem Invasionswert von 122% des Wildtyps.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Infektionsexperimente in drei Zelllinien der Infektionsweg von *C. sakazakii* ES5 nachgestellt, neue potentielle Virulenz-assoziierte Faktoren identifiziert und die Fähigkeit der spezifischen Anpassung an das intrazelluläre Milieu als ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal bestätigt werden.

VII. SUMMARY

Investigation of the role of potential virulence factors of *Cronobacter sakazakii* ES5

Cronobacter sakazakii is an opportunistic Gram-negative food-borne pathogen, which is mainly a problem in powdered infant formula (PIF), because of its ability to cause severe necrotizing enterocolitis (NEC), septicemia and meningitis in neonates.

Despite the efforts over the last years, still little is known about the pathogenesis of *C. sakazakii* and its crucial virulence mechanisms.

To gain further insight about pathogenic mechanisms of *C. sakazakii*, 28 mutants of the clinical strain *C. sakazakii* ES5 have been screened in this study for their potential to adhere, invade and proliferate in eukaryotic cells. The inactivated genes encode for proteins playing a role in energy production and conversion, as well as in cell membrane biogenesis, biofilm-formation, motility and carotenoid biosynthesis. Reflecting the course of infection of *C. sakazakii* *in vivo* - oral infection of the host organism, primary local infection of the gastro-intestinal tract (GIT), systemic spread by invading in macrophages and finally crossing the blood-brain-barrier (BBB) and infecting the brain - three cell lines Caco-2 gastrointestinal epithelial cells, RAW-264.7 as mononuclear phagocytic cells, and HBMEC brain-micro-endothelial were selected as cell culture study system.

The screening in all three cell lines showed reduced invasion by nearly 100% of both flagella mutants without or short and brittle flagella. This suggests that flagella are important for the pathogenesis of *Cronobacter*. The attenuation might be caused by reduced motility, instable interaction between flagella and the host cell or missing secretion of virulence factors through the Type III flagellar secretion system. Further investigations using motility-assays showed that flagellar motility of *C. sakazakii* seems to be regulated by suppression. Typically, in motility assays, flagella-induced swimming of *C. sakazakii* ES5 is inhibited, but e.g. upon addition of sterile-filtrated supernatant of a *C. sakazakii* ES5 culture, swimming was observed.

Two mutants with reduced resistance to serum showed decreased virulence, as well as one mutant in which a putative ribosome maturation factor for the 30S

ribosomal subunit was disrupted. The inactivated genes of these three mutants could encode potential virulence factors and have to be investigated in detail.

Mutants from the orthologous group for energy production and conversion were also less invasive in eukaryotic cells. In the utilization of carbon sources, in particular of amino acids and intermediary catabolic products, those strains differ from the wild type strain. For instance, disruption of the citrate cycle, led to a decreased usage of L-glutamic acid, but increased the catabolism of L-asparagine. This showed that *C. sakazakii* ES5 was able to efficiently adapt its metabolism in response to the mutation.

In comparison with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the carbon metabolism of *C. sakazakii* showed several interesting differences: in contrast to *S. Typhimurium*, *Cronobacter* spp. was able to use a variety of carbon sources present in soil. This suggests that *Cronobacter* spp. might be descended from a common ancestor that had plant-associated lifestyle. Surprisingly, glucose-6-phosphate, which is known to be the preferred intracellular carbon source of enterobacterial pathogens, besides glucose and mannose, could not be used as carbon source by *C. sakazakii* *in vitro*. It would be interesting to investigate, if intracellular *C. sakazakii* is able to modify its metabolism for using glucose-6-phosphate inside the host.

C. sakazakii is a yellow pigmented bacteria species that synthesizes its pigments by carotenoid biosynthesis. Infection assays showed attenuation of colorless strains in invasion of RAW-264.7 cells. In this context, it was determined that *de novo* carotenoid synthesis CrtY protein catalyzes the reaction of lycopene to β -carotene. After complementation, the *crtY*-mutant showed the typical yellow pigmentation of wild-type colonies, instead of the pink mutant colonies. The reduced invasion of HBMEC cells by more than 30% in comparison with wild-type cells could also be restored by complementation. Constitutive expression of the *crtY* gene in the mutant background led to an increased invasion of HBMEC cells of 122% compared to ES5 wild-type cells.

In this study, *C. sakazakii* ES5 infection experiments of three different cell lines were used to identify new virulence-associated factors and to investigate the ability of *C. sakazakii* to specifically adapt to the intracellular environment, which represents a crucial feature for its pathogenic lifestyle.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Allen, J.H., Utley, M., van Den Bosch, H., Nuijten, P., Witvliet, M., McCormick, B.A., Krogfelt, K.A., Licht, T.R., Brown, D., Mael, M., Leatham, M.P., Laux, D.C., Cohen, P.S., 2000. A functional *cra* gene is required for *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in BALB/c mice. *Infection and immunity* 68, 3772-3775.

Baban, S.T., Kuehne, S.A., Barketi-Klai, A., Cartman, S.T., Kelly, M.L., Hardie, K.R., Kansau, I., Collignon, A., Minton, N.P., 2013. The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. *PloS one* 8, e73026.

Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg, O., Block, C., Arad, I., 2001. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992) 90, 356-358.

Bennett, J.C., Thomas, J., Fraser, G.M., Hughes, C., 2001. Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Molecular microbiology* 39, 781-791.

Berg, H.C., 2003. The rotary motor of bacterial flagella. *Annual review of biochemistry* 72, 19-54.

Bochner, B.R., 2003. New technologies to assess genotype-phenotype relationships. *Nature reviews. Genetics* 4, 309-314.

Bochner, B.R., Gadzinski, P., Panomitros, E., 2001. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome research* 11, 1246-1255.

Bowen, A.B., Braden, C.R., 2006. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging infectious diseases* 12, 1185-1189.

Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P., 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. Systematic and applied microbiology 36, 309-319.

Buelow, D.R., Christensen, J.E., Neal-McKinney, J.M., Konkel, M.E., 2011. *Campylobacter jejuni* survival within human epithelial cells is enhanced by the secreted protein CiaI. Molecular microbiology 80, 1296-1312.

Burton, B.M., Marquis, K.A., Sullivan, N.L., Rapoport, T.A., Rudner, D.Z., 2007. The ATPase SpoIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*. Cell 131, 1301-1312.

Campbell, J.W., Cronan, J.E., Jr., 2001. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. Journal of bacteriology 183, 5982-5990.

Cano, D.A., Dominguez-Bernal, G., Tierrez, A., Garcia-Del Portillo, F., Casadesus, J., 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. Genetics 162, 1513-1523.

Carranza, P., Hartmann, I., Lehner, A., Stephan, R., Gehrig, P., Grossmann, J., Barkow-Oesterreicher, S., Roschitzki, B., Eberl, L., Riedel, K., 2009. Proteomic

profiling of *Cronobacter turicensis* 3032, a food-borne opportunistic pathogen. Proteomics 9, 3564-3579.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual review of microbiology 41, 435-464.

Cruz-Cordova, A., Rocha-Ramirez, L.M., Ochoa, S.A., Gonzalez-Pedrajo, B., Espinosa, N., Eslava, C., Hernandez-Chinas, U., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Leviz, A., Valencia-Mayoral, P., Sadowinski-Pine, S., Hernandez-Castro, R., Estrada-Garcia, I., Munoz-Hernandez, O., Rosas, I., Xicohtencatl-Cortes, J., 2012. Flagella from Five *Cronobacter* Species Induce Pro-Inflammatory Cytokines in Macrophage Derivatives from Human Monocytes. PloS one 7.

Dingle, T.C., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., 2011. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters. Infection and immunity 79, 4061-4067.

Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., Zhu, G., 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. Journal of basic microbiology 53, 1-8.

Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., Goebel, W., 2010. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. Nature reviews. Microbiology 8, 401-412.

Emami, C.N., Mittal, R., Wang, L., Ford, H.R., Prasadaraao, N.V., 2011. Recruitment of dendritic cells is responsible for intestinal epithelial damage in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by *Cronobacter sakazakii*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 186, 7067-7079.

Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., Brenner, D.J., +, a.T.E.S.G., 1980. *Enterobacter sakazakii*: A New Species of "Enterobacteriaceae" Isolated from Clinical Specimens. International Journal of Systematic Bacteriology 30, 569-584.

Fraser, G.M., Bennett, J.C., Hughes, C., 1999. Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Molecular microbiology* 32, 569-580.

Friedemann, M., 2008. [*Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 51, 664-674.

Friedemann, M., 2009. Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 28, 1297-1304.

Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D.J., Gominet, M., Lereclus, D., Wong, A.C., Senesi, S., 2002. Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology* 184, 6424-6433.

Gore, A.L., Payne, S.M., 2010. CsrA and Cra influence *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infection and immunity* 78, 4674-4682.

Gosney, M.A., Martin, M.V., Wright, A.E., Gallagher, M., 2006. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *European journal of internal medicine* 17, 185-188.

Gotz, A., Eylert, E., Eisenreich, W., Goebel, W., 2010. Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *PloS one* 5, e10586.

Gotz, A., Goebel, W., 2010. Glucose and glucose 6-phosphate as carbon sources in extra- and intracellular growth of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Microbiology (Reading, England)* 156, 1176-1187.

Grimm, M., Stephan, R., Iversen, C., Manzardo, G.G., Rattei, T., Riedel, K., Ruepp, A., Frishman, D., Lehner, A., 2008. Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms. Journal of food protection 71, 13-18.

Guo, Z., Zhou, M., Duan, Q., Zhu, G., 2014. [Advance on the pathogenicity and immunological application of bacterial flagella--a review]. Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica 54, 251-260.

Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., Beuchat, L.R., 2005. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. International journal of food microbiology 104, 1-34.

Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L., Riedel, K., 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. Applied and environmental microbiology 76, 2251-2261.

Hasegawa, K., Yamashita, I., Namba, K., 1998. Quasi- and nonequivalence in the structure of bacterial flagellar filament. Biophysical journal 74, 569-575.

Hayashi, N., Matsukawa, M., Horinishi, Y., Nakai, K., Shoji, A., Yoneko, Y., Yoshida, N., Minagawa, S., Gotoh, N., 2013. Interplay of flagellar motility and mucin degradation stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* with human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy 19, 305-315.

Haydon, D.J., Guest, J.R., 1991. A new family of bacterial regulatory proteins. FEMS microbiology letters 63, 291-295.

Hirano, T., Minamino, T., Macnab, R.M., 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. Journal of molecular biology 312, 359-369.

Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., Macnab, R.M., 2003. Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *Journal of bacteriology* 185, 2485-2492.

Hirano, T., Mizuno, S., Aizawa, S., Hughes, K.T., 2009. Mutations in *flk*, *flgG*, *flhA*, and *flhE* that affect the flagellar type III secretion specificity switch in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology* 191, 3938-3949.

Hmiel, S.P., Snavelly, M.D., Florer, J.B., Maguire, M.E., Miller, C.G., 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *Journal of bacteriology* 171, 4742-4751.

Holy, O., Forsythe, S., 2013. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *The Journal of hospital infection*.

Inaba, S., Hashimoto, M., Jyot, J., Aizawa, S., 2013. Exchangeability of the flagellin (FliC) and the cap protein (FliD) among different species in flagellar assembly. *Biopolymers* 99, 63-72.

Island, M.D., Wei, B.Y., Kadner, R.J., 1992. Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* 174, 2754-2762.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC evolutionary biology* 7, 64.

Jaradat, Z.W., Al Mousa, W., Elbetieha, A., Al Nabulsi, A., Tall, B.D., 2014. *Cronobacter* spp. - opportunistic food-borne pathogens. A review of their

virulence and environmental-adaptive traits. Journal of medical microbiology 63, 1023-1037.

Jaradat, Z.W., Rashdan, A.M., Ababneh, Q.O., Jaradat, S.A., Bhunia, A.K., 2011. Characterization of surface proteins of *Cronobacter muytjensii* using monoclonal antibodies and MALDI-TOF Mass spectrometry. BMC microbiology 11, 148.

Johler, S., Stephan, R., Hartmann, I., Kuehner, K.A., Lehner, A., 2010. Genes involved in yellow pigmentation of *Cronobacter sakazakii* ES5 and influence of pigmentation on persistence and growth under environmental stress. Applied and environmental microbiology 76, 1053-1061.

Joseph, P., Fantino, J.R., Herbaud, M.L., Denizot, F., 2001. Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. FEMS microbiology letters 205, 91-97.

Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M.J., Forsythe, S.J., 2012. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* sp. *genomospecies* 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients. International journal of systematic and evolutionary microbiology 62, 1277-1283.

Kim, J.S., Chang, J.H., Chung, S.I., Yum, J.S., 1999. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* *flaD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. Journal of bacteriology 181, 6969-6976.

Kim, K., Kim, K.P., Choi, J., Lim, J.A., Lee, J., Hwang, S., Ryu, S., 2010. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Applied and environmental microbiology 76, 5188-5198.

Kim, K.P., Loessner, M.J., 2008. *Enterobacter sakazakii* invasion in human intestinal Caco-2 cells requires the host cell cytoskeleton and is enhanced by disruption of tight junction. Infection and immunity 76, 562-570.

Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B., Mickelson, J., 2004. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *Journal of bacteriology* 186, 3296-3303.

Krasny, L., Rohlova, E., Ruzickova, H., Santrucek, J., Hynek, R., Hochel, I., 2014. Differentiation of *Cronobacter* spp. by tryptic digestion of the cell suspension followed by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of microbiological methods* 98C, 105-113.

Kroger, C., Fuchs, T.M., 2009. Characterization of the myo-inositol utilization island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* 191, 545-554.

Kucerova, E., Clifton, S.W., Xia, X.Q., Long, F., Porwollik, S., Fulton, L., Fronick, C., Minx, P., Kyung, K., Warren, W., Fulton, R., Feng, D., Wollam, A., Shah, N., Bhonagiri, V., Nash, W.E., Hallsworth-Pepin, K., Wilson, R.K., McClelland, M., Forsythe, S.J., 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PloS one* 5, e9556.

Kutsukake, K., Minamino, T., Yokoseki, T., 1994. Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* 176, 7625-7629.

Lee, J., Harshey, R.M., 2012. Loss of FlhE in the flagellar Type III secretion system allows proton influx into *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 84, 550-565.

Lehner, A., Grimm, M., Rattei, T., Ruepp, A., Frishman, D., Manzardo, G.G., Stephan, R., 2006. Cloning and characterization of *Enterobacter sakazakii* pigment genes and in situ spectroscopic analysis of the pigment. *FEMS microbiology letters* 265, 244-248.

- Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B., Stephan, R., 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *Journal of food protection* 68, 2287-2294.
- MacLean, L.L., Vinogradov, E., Pagotto, F., Farber, J.M., Perry, M.B., 2009. Characterization of the O-antigen in the lipopolysaccharide of *Cronobacter (Enterobacter) malonaticus* 3267. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 87, 927-932.
- Macnab, R.M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology* 57, 77-100.
- Majdalani, N., Gottesman, S., 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annual review of microbiology* 59, 379-405.
- Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., Namba, K., 2003. Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15528-15533.
- Maki, S., Vonderviszt, F., Furukawa, Y., Imada, K., Namba, K., 1998. Plugging interactions of HAP2 pentamer into the distal end of flagellar filament revealed by electron microscopy. *Journal of molecular biology* 277, 771-777.
- Merino, S., Gavin, R., Altarriba, M., Izquierdo, L., Maguire, M.E., Tomas, J.M., 2001. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. *FEMS microbiology letters* 198, 189-195.
- Minamino, T., Iino, T., Kutuskake, K., 1994. Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium flhB* operon and its protein products. *Journal of bacteriology* 176, 7630-7637.

- Mittal, R., Bulgheresi, S., Emami, C., Prasadaraao, N.V., 2009. *Enterobacter sakazakii* targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 183, 6588-6599.
- Mondol, M.A., Shin, H.J., Islam, M.T., 2013. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine drugs* 11, 2846-2872.
- Morgenstein, R.M., Clemmer, K.M., Rather, P.N., 2010. Loss of the waaL O-antigen ligase prevents surface activation of the flagellar gene cascade in *Proteus mirabilis*. *Journal of bacteriology* 192, 3213-3221.
- Mullane, N., O'Gaora, P., Nally, J.E., Iversen, C., Whyte, P., Wall, P.G., Fanning, S., 2008. Molecular analysis of the *Enterobacter sakazakii* O-antigen gene locus. *Applied and environmental microbiology* 74, 3783-3794.
- Nord, S., Bylund, G.O., Lovgren, J.M., Wikstrom, P.M., 2009. The RimP protein is important for maturation of the 30S ribosomal subunit. *Journal of molecular biology* 386, 742-753.
- O'Neil, H.S., Marquis, H., 2006. *Listeria monocytogenes* Flagella Are Used for Motility, Not as Adhesins, To Increase Host Cell Invasion[∇]. *Infection and immunity* 74, 6675-6681.
- Pagotto, F.J., Farber, J.M., 2009. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): advice, policy and research in Canada. *International journal of food microbiology* 136, 238-245.
- Pagotto, F.J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., Farber, J.M., 2003. *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *Journal of food protection* 66, 370-375.

Prado-Cabrero, A., Schaub, P., Diaz-Sanchez, V., Estrada, A.F., Al-Babili, S., Avalos, J., 2009. Deviation of the neurosporaxanthin pathway towards beta-carotene biosynthesis in *Fusarium fujikuroi* by a point mutation in the phytoene desaturase gene. The FEBS journal 276, 4582-4597.

Reshamwala, S.M., Noronha, S.B., 2011. Biofilm formation in *Escherichia coli* cra mutants is impaired due to down-regulation of curli biosynthesis. Archives of microbiology 193, 711-722.

Richardson, E.J., Limaye, B., Inamdar, H., Datta, A., Manjari, K.S., Pullinger, G.D., Thomson, N.R., Joshi, R.R., Watson, M., Stevens, M.P., 2011. Genome sequences of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, Choleraesuis, Dublin, and Gallinarum strains of well-defined virulence in food-producing animals. Journal of bacteriology 193, 3162-3163.

Saier, M.H., Jr., Ramseier, T.M., 1996. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. Journal of bacteriology 178, 3411-3417.

Saiki, K., Nakamura, H., Mogi, T., Anraku, Y., 1996. Probing a role of subunit IV of the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase by deletion and cross-linking analyses. The Journal of biological chemistry 271, 15336-15340.

Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Namba, K., 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. Nature 410, 331-337.

Schwizer, S., Tasara, T., Zurfluh, K., Stephan, R., Lehner, A., 2013. Identification of genes involved in serum tolerance in the clinical strain *Cronobacter sakazakii* ES5. BMC microbiology 13, 38.

See, K.C., Than, H.A., Tang, T., 2007. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report. Age and ageing 36, 595-596.

Shin, H., Lee, J.H., Choi, Y., Ryu, S., 2012. Complete genome sequence of the opportunistic food-borne pathogen *Cronobacter sakazakii* ES15. *Journal of bacteriology* 194, 4438-4439.

Singamsetty, V.K., Wang, Y., Shimada, H., Prasadaraao, N.V., 2008. Outer membrane protein A expression in *Enterobacter sakazakii* is required to induce microtubule condensation in human brain microvascular endothelial cells for invasion. *Microbial pathogenesis* 45, 181-191.

Sivamaruthi, B.S., Ganguli, A., Kumar, M., Bhaviya, S., Pandian, S.K., Balamurugan, K., 2011. *Caenorhabditis elegans* as a model for studying *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 pathogenesis. *Journal of basic microbiology* 51, 540-549.

Smith, S.G., Mahon, V., Lambert, M.A., Fagan, R.P., 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters* 273, 1-11.

Snavely, M.D., Florer, J.B., Miller, C.G., Maguire, M.E., 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: 28Mg²⁺ transport by the CorA, MgtA, and MgtB systems. *Journal of bacteriology* 171, 4761-4766.

Solano, C., Echeverez, M., Lasa, I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current opinion in microbiology* 18C, 96-104.

Stafford, G.P., Hughes, C., 2007. *Salmonella typhimurium* flhE, a conserved flagellar regulon gene required for swarming. *Microbiology (Reading, England)* 153, 541-547.

Stephan, R., Grim, C.J., Gopinath, G.R., Mammel, M.K., Sathyamoorthy, V., Trach, L.H., Chase, H.R., Fanning, S., Tall, B.D., 2014. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris*, and *Enterobacter turicensis* as members of *Cronobacter* and description of *Siccibacter turicensis* com. nov., *Franconibacter helveticus* comb. nov., and

Franconibacter pulveris com. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology.

Stephan, R., Lehner, A., Tischler, P., Rattei, T., 2011. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates. Journal of bacteriology 193, 309-310.

Sun, Y., Wang, M., Wang, Q., Cao, B., He, X., Li, K., Feng, L., Wang, L., 2012. Genetic analysis of the *Cronobacter sakazakii* O4 to O7 O-antigen gene clusters and development of a PCR assay for identification of all *C. sakazakii* O serotypes. Applied and environmental microbiology 78, 3966-3974.

Townsend, S., Caubilla Barron, J., Loc-Carrillo, C., Forsythe, S., 2007a. The presence of endotoxin in powdered infant formula milk and the influence of endotoxin and *Enterobacter sakazakii* on bacterial translocation in the infant rat. Food microbiology 24, 67-74.

Townsend, S.M., Hurrell, E., Gonzalez-Gomez, I., Lowe, J., Frye, J.G., Forsythe, S., Badger, J.L., 2007b. *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. Microbiology (Reading, England) 153, 3538-3547.

van Aalten, D.M., DiRusso, C.C., Knudsen, J., Wierenga, R.K., 2000. Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold. The EMBO journal 19, 5167-5177.

Verhamme, D.T., Postma, P.W., Crielgaard, W., Hellingwerf, K.J., 2002. Cooperativity in signal transfer through the Uhp system of *Escherichia coli*. Journal of bacteriology 184, 4205-4210.

Yan, Q., Power, K.A., Cooney, S., Fox, E., Gopinath, G.R., Grim, C.J., Tall, B.D., McCusker, M.P., Fanning, S., 2013. Complete genome sequence and phenotype microarray analysis of *Cronobacter sakazakii* SP291: a persistent isolate cultured

from a powdered infant formula production facility. *Frontiers in microbiology* 4, 256.

Yan, Q.Q., Condell, O., Power, K., Butler, F., Tall, B.D., Fanning, S., 2012. *Cronobacter species* (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *Journal of applied microbiology* 113, 1-15.

Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D.G., DeRosier, D.J., Vonderviszt, F., Imada, K., Namba, K., 2000. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science (New York, N.Y.)* 290, 2148-2152.

Young, G.M., Schmiel, D.H., Miller, V.L., 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6456-6461.

Zhang, W., Hu, X., Wang, L., Wang, X., 2014. Reconstruction of the carotenoid biosynthetic pathway of *Cronobacter sakazakii* BAA894 in *Escherichia coli*. *PloS one* 9, e86739.

Zhao, Z., Wang, L., Wang, B., Liang, H., Ye, Q., Zeng, M., 2014. Complete Genome Sequence of *Cronobacter sakazakii* Strain CMCC 45402. *Genome announcements* 2.

IX. ANHANG

Tab. 18: Analyse der Kolonisation von verschiedenen *C. sakazakii* ES5-Stämmen im zeitlichen Verlauf von 7 h. Die Mittelwerte aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	Bakterien-Titer (CFU/ml) in Caco-2-Zellen				Bakterien-Titer (CFU/ml) in RAW-264.7-Zellen				Bakterien-Titer (CFU/ml) in HBMEC-Zellen			
	0	0,5	2,5	7	0	0,5	2	7	0	0,5	2,5	7
<i>Csa</i> ES5 (WT)	5,98E+06	1,64E+05	1,89E+05	2,43E+05	7,37E+06	2,62E+06	6,32E+06	9,42E+06	1,01E+07	1,51E+06	3,72E+05	4,97E+05
ESA_01356	6,69E+06	1,40E+05	8,78E+04	1,32E+05	5,43E+06	1,60E+06	4,18E+06	8,43E+06	6,81E+06	1,60E+06	7,52E+04	1,27E+05
ESA_04103	5,45E+06	4,61E+04	2,21E+05	2,28E+05	9,16E+06	4,40E+06	1,07E+07	9,61E+06	1,39E+07	1,43E+06	1,51E+05	7,60E+04
ESA_01287	3,64E+06	5,34E+04	4,94E+02	5,66E+02	2,33E+06	8,61E+03	2,20E+05	9,54E+05	6,14E+06	1,39E+05	2,83E+02	2,67E+02
ESA_04204	9,35E+06	1,34E+05	1,16E+05	1,32E+05	7,65E+06	1,44E+06	3,97E+06	7,23E+06	8,39E+06	1,16E+06	2,88E+05	4,60E+05
ESA_04207	4,18E+06	1,01E+05	2,64E+05	4,01E+05	9,64E+06	3,07E+06	7,73E+06	1,14E+07	1,25E+07	6,25E+05	3,37E+05	4,64E+05
ESA_02266	1,25E+07	7,11E+04	3,54E+03	5,69E+03	1,43E+07	1,67E+05	9,71E+04	1,56E+05	1,84E+07	1,62E+05	1,28E+02	3,72E+02
ESA_00281	8,23E+06	7,04E+04	1,85E+05	2,77E+05	1,12E+07	1,49E+06	5,19E+06	8,60E+06	1,48E+07	8,92E+05	7,95E+05	8,01E+05
ESA_00282	7,17E+06	7,32E+04	1,73E+05	3,35E+05	1,28E+07	2,07E+06	5,96E+06	8,56E+06	1,33E+07	8,95E+05	9,70E+05	8,64E+05
ESA_04343	1,11E+07	7,14E+04	1,94E+05	4,58E+05	1,71E+07	9,53E+05	4,05E+06	1,16E+07	1,49E+07	1,18E+06	3,85E+05	6,41E+05
ESA_02873	1,25E+07	4,68E+05	3,23E+05	2,77E+05	6,62E+06	1,70E+06	5,59E+06	8,54E+06	8,71E+06	1,20E+06	4,07E+05	4,92E+05
ESA_00861	7,88E+06	1,42E+05	1,42E+05	2,27E+05	8,71E+06	3,55E+06	1,02E+07	1,55E+07	1,24E+07	6,36E+05	1,59E+05	2,49E+05
ESA_pESA3	6,13E+06	1,54E+05	1,21E+05	1,13E+05	8,31E+06	1,41E+06	4,83E+06	6,03E+06	8,03E+06	1,21E+06	3,64E+05	4,59E+05
ESA_02622	6,43E+06	7,38E+04	5,24E+04	8,92E+04	5,53E+06	3,68E+05	3,95E+05	3,21E+06	8,63E+06	1,15E+06	5,16E+04	4,58E+04
ESA_02621	6,27E+06	3,24E+04	4,12E+04	4,15E+04	8,62E+06	1,64E+05	2,23E+05	2,79E+06	9,00E+06	3,29E+05	2,17E+04	1,41E+04
ESA_03622	8,09E+06	5,71E+04	2,55E+05	6,31E+05	1,20E+07	6,62E+05	2,01E+06	6,25E+06	1,66E+07	5,16E+05	1,84E+05	3,17E+05
ESA_00344	7,99E+06	4,70E+04	1,64E+05	3,50E+05	1,57E+07	1,49E+06	4,43E+06	7,07E+06	7,83E+06	2,05E+06	8,93E+04	1,92E+05
ESA_00344	5,16E+06	1,17E+05	1,27E+05	2,29E+05	9,22E+06	8,46E+05	2,73E+06	7,77E+06	9,67E+06	1,13E+06	2,44E+05	7,33E+05
ESA_00345	5,08E+06	1,01E+05	1,01E+05	2,75E+05	5,41E+06	3,73E+05	1,77E+06	6,85E+06	6,43E+06	1,07E+06	1,16E+05	4,05E+05
ESA_00343	5,35E+06	3,30E+04	1,57E+05	3,69E+05	1,04E+07	6,53E+05	3,96E+06	6,08E+06	8,39E+06	7,85E+05	2,22E+05	5,89E+05
ESA_00342	5,79E+06	5,05E+04	1,42E+05	2,91E+05	6,95E+06	6,85E+05	1,73E+06	4,21E+06	9,41E+06	1,24E+06	1,57E+05	4,93E+05
ESA_00343	7,79E+06	7,77E+04	1,53E+05	3,47E+05	1,34E+07	2,14E+06	5,25E+06	1,00E+07	1,04E+07	4,79E+05	3,35E+05	3,34E+05
ESA_00345	9,32E+06	1,82E+05	1,67E+05	3,18E+05	1,16E+07	9,72E+05	1,84E+06	4,15E+06	1,35E+07	1,79E+06	3,07E+05	3,30E+05
ESA_00347	6,71E+06	6,74E+04	1,62E+05	3,72E+05	1,20E+07	1,25E+06	3,48E+06	6,55E+06	1,33E+07	9,40E+05	3,74E+05	8,62E+05
ESA_02449	3,94E+06	6,04E+04	2,23E+04	1,50E+04	9,03E+06	2,19E+05	2,30E+05	8,06E+05	1,82E+07	2,35E+06	1,68E+04	1,90E+04
ESA_03563	9,80E+06	1,94E+05	7,64E+04	1,32E+05	1,12E+07	2,70E+05	5,39E+05	6,23E+06	1,48E+07	2,12E+06	4,53E+04	9,79E+04
ESA_03258	5,94E+06	1,61E+05	2,21E+05	3,37E+05	5,35E+06	3,22E+05	1,66E+06	6,06E+06	4,89E+06	9,80E+05	3,56E+05	4,71E+05
ESA_04029	8,47E+06	1,44E+05	1,87E+05	4,58E+05	8,08E+06	4,26E+05	1,13E+06	7,39E+06	1,53E+07	7,66E+05	3,87E+05	5,49E+05
ES5, puc19	9,36E+06	1,72E+05	1,90E+05	2,89E+05	1,10E+07	1,06E+06	4,07E+06	5,26E+06	1,12E+07	8,73E+05	1,54E+05	8,16E+05
	6,03E+06	1,24E+05	1,98E+05	3,11E+05	8,17E+06	5,61E+05	1,09E+06	3,02E+06	1,03E+07	1,02E+06	1,95E+05	2,21E+05
	2,89E+06	7,00E+04	1,21E+05	2,92E+05	3,24E+06	4,98E+05	1,22E+06	2,53E+06	4,17E+06	4,97E+05	1,15E+05	4,15E+05
	1,21E+07	3,60E+04	9,15E+04	6,28E+04	1,07E+07	1,30E+05	6,17E+05	1,07E+06	1,35E+07	4,12E+05	4,12E+04	2,79E+04
ESA_02391												

Tab. 19: Extinktionswerte der colorimetrischen Bestimmung der Kohlenstoffverwertung bei *C. sakazakii* ES5 Biofilm- und Serummutanten nach 24 h. Die Mittelwerte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	BF1	BF2	BF4	BF5	BF8	BF9	BF12	BF13	BF14	BF15	BF16	BF17	51_C4	51_C6
2-Desoxy Adenosin	0,606	0,568	0,562	0,615	0,594	0,610	0,578	0,488	0,467	0,415	0,598	0,594	0,652	0,602
Acetic Acid (Essigsäure 96%)	0,065	-0,002	0,060	0,062	0,034	0,039	0,033	0,006	0,001	-0,006	0,026	-0,011	0,049	0,125
Adenosin	0,681	0,686	0,622	0,695	0,747	0,661	0,636	0,638	0,629	0,581	0,693	0,603	0,656	0,634
α-D-Glucose	0,686	0,677	0,658	0,682	0,776	0,746	0,717	0,641	0,703	0,634	0,793	0,718	0,710	0,728
α-D-Lactose	0,010	-0,055	-0,040	-0,046	0,009	-0,064	-0,069	0,008	-0,034	-0,063	-0,004	0,024	-0,006	0,550
Adonitol	-0,055	-0,080	-0,079	-0,016	-0,035	-0,088	-0,103	-0,021	-0,056	-0,081	-0,052	-0,112	-0,004	-0,106
α-Methyl-D-Glucosid	0,677	-0,044	-0,019	0,580	0,659	0,322	-0,042	0,549	0,005	-0,039	0,243	-0,024	0,394	0,622
Amygdalin	-0,006	-0,057	-0,049	0,019	0,029	-0,020	-0,061	0,025	-0,046	-0,057	-0,030	-0,053	-0,040	0,006
Arbutin	0,586	0,664	0,624	0,728	0,720	0,677	0,668	0,710	0,406	0,358	0,682	0,622	0,646	0,593
Zitronensäure	0,505	0,342	0,385	0,428	0,508	0,547	0,319	0,469	0,501	0,538	0,490	0,488	0,424	0,503
Kreatin	-0,049	-0,081	-0,086	-0,117	-0,037	-0,086	-0,110	-0,023	-0,058	-0,030	-0,089	-0,052	0,020	-0,118
D-Alanin	0,089	0,137	0,270	-0,106	-0,015	0,089	0,030	0,009	0,086	0,179	0,163	0,150	0,180	0,261
D-Galactose	0,662	0,668	0,602	0,715	0,770	0,719	0,692	0,699	0,650	0,639	0,715	0,698	0,813	0,625
D,L-Äpfelsäure	0,152	0,223	0,288	0,142	0,126	0,191	0,160	0,282	0,266	0,227	0,173	0,278	0,278	0,202
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,765	0,782	0,697	0,775	0,821	0,792	0,733	0,778	0,783	0,843	0,736	0,803	0,753	
D-Arabinose	-0,028	-0,046	0,000	-0,088	-0,017	-0,023	-0,037	-0,019	-0,026	-0,027	0,033	0,013	0,048	-0,028
D-Cellobiose	0,745	0,779	0,757	0,819	0,834	0,755	0,748	0,821	0,736	0,753	0,827	0,714	0,812	0,710
D-Fructose	0,652	0,664	0,665	0,685	0,729	0,725	0,707	0,614	0,671	0,679	0,780	0,717	0,690	0,759
D-Galacturonsäure	0,533	0,573	0,581	0,681	0,687	0,666	0,585	0,656	0,586	0,631	0,664	0,636	0,644	0,651
D-Glucosamin	0,640	0,662	0,574	0,753	0,747	0,729	0,668	0,667	0,589	0,684	0,729	0,594	0,728	0,715
D-Glucose-6-Phosphat	-0,008	-0,053	-0,056	-0,017	0,070	-0,032	-0,074	0,016	-0,047	-0,039	-0,050	-0,047	0,014	-0,075
D-Glucuronsäure	0,656	0,533	0,497	0,610	0,628	0,632	0,507	0,594	0,456	0,570	0,596	0,572	0,471	0,630
Dulcitol	-0,049	-0,080	-0,084	-0,123	-0,039	-0,090	-0,111	-0,015	-0,059	-0,080	-0,089	-0,025	-0,014	-0,119
D-Äpfelsäure	-0,064	-0,087	-0,094	-0,121	-0,041	-0,094	-0,117	-0,027	-0,064	-0,087	-0,037	-0,042	0,059	-0,107
D-Mannitol = Mannit	0,655	0,696	0,641	0,676	0,758	0,727	0,687	0,722	0,678	0,685	0,749	0,619	0,860	0,705
D-Mannose	0,748	0,736	0,673	0,720	0,748	0,796	0,743	0,717	0,690	0,701	0,809	0,790	0,869	0,713
D-Melibiose	0,799	0,801	0,820	0,799	0,855	0,826	0,781	0,814	0,802	0,823	0,877	0,776	0,912	0,807
D-Raffinose	0,765	0,797	0,829	0,784	0,873	0,813	0,784	0,892	0,803	0,792	0,884	0,827	0,927	0,775
D-Ribose	0,507	0,536	0,618	0,619	0,644	0,626	0,595	0,689	0,546	0,620	0,650	0,638	0,830	0,663
D-Sorbitol	-0,042	-0,059	-0,026	-0,050	-0,026	-0,079	-0,095	0,016	-0,035	-0,066	-0,018	-0,005	-0,031	-0,062
D-Trehalose	0,795	0,798	0,774	0,842	0,843	0,821	0,777	0,807	0,798	0,796	0,824	0,806	0,846	0,738
D-Xylose	0,645	0,626	0,568	0,698	0,739	0,636	0,625	0,654	0,562	0,580	0,678	0,579	0,761	0,571
Ameisensäure	0,013	-0,058	-0,066	0,058	0,116	0,006	0,019	0,063	-0,041	-0,063	-0,001	-0,039	0,196	0,047
Fumarsäure	0,317	0,021	0,307	-0,073	0,032	0,034	-0,023	0,043	0,216	0,066	0,059	0,138	0,333	0,178
Gentiobiose	0,701	0,688	0,654	0,661	0,719	0,670	0,732	0,603	0,648	0,641	0,774	0,718	0,772	0,690
Glycerol	0,360	0,473	0,438	0,629	0,636	0,521	0,442	0,667	0,480	0,478	0,467	0,484	0,582	0,363
Glyoxylsäure	-0,016	0,027	0,037	-0,074	-0,015	0,062	-0,033	0,027	0,030	0,038	-0,028	0,108	0,015	0,138
Inosin	0,732	0,696	0,658	0,692	0,749	0,736	0,691	0,640	0,656	0,634	0,757	0,719	0,848	0,688
Lactose	0,240	0,103	0,188	0,140	0,068	0,174	0,175	0,113	0,116	0,154	0,146	0,246	0,181	0,594
Lactulose	0,019	0,018	0,109	0,026	0,012	-0,010	0,062	0,020	0,039	0,043	0,032	0,155	-0,050	0,110
L-Alanin	0,282	0,460	0,497	0,275	0,233	0,492	0,436	0,234	0,462	0,470	0,479	0,596	0,189	0,326
L-Arabinose	0,601	0,583	0,576	0,628	0,632	0,643	0,606	0,634	0,550	0,597	0,693	0,633	0,784	0,686
L-Arabitol	-0,057	-0,080	-0,083	-0,128	-0,042	-0,088	-0,113	-0,020	-0,060	-0,087	-0,030	-0,028	0,025	-0,117
L-Arginin	-0,050	-0,072	-0,076	-0,105	-0,027	-0,077	-0,106	-0,015	-0,052	-0,074	-0,032	-0,095	0,044	-0,103
L-Asparagin	0,022	-0,025	0,006	-0,069	0,077	0,022	-0,030	0,016	-0,007	-0,036	-0,005	-0,033	0,111	0,125
L-Asparaginsäure	0,134	0,055	0,024	0,036	0,046	-0,006	-0,051	0,158	0,033	-0,031	-0,026	-0,017	0,232	0,123
L-Fucose	0,031	0,032	-0,015	-0,014	0,004	-0,050	-0,083	0,083	-0,009	-0,053	-0,015	0,048	0,076	-0,056
L-Glutaminsäure	0,254	0,197	0,300	0,170	0,156	0,304	0,243	0,234	0,210	0,268	0,233	0,254	0,292	0,580
L-Glutamin	0,413	0,655	0,774	0,686	0,649	0,787	0,805	0,573	0,575	0,638	0,806	0,727	0,627	0,752
L-Histidin	0,071	0,102	0,155	-0,017	0,023	0,165	0,153	0,020	0,093	0,166	0,129	0,223	0,007	0,114
L-Isoleucin	0,031	0,053	0,103	-0,002	0,033	0,133	0,112	0,029	0,057	0,124	0,111	0,171	0,029	0,181
L-Milchsäure	0,348	0,401	0,440	0,357	0,341	0,423	0,439	0,319	0,415	0,450	0,435	0,526	0,238	0,590
L-Leucin	-0,017	-0,030	0,019	-0,028	-0,014	-0,067	-0,074	-0,010	-0,028	-0,039	-0,014	0,018	0,084	-0,017
L-Lysin	-0,027	-0,049	-0,010	-0,088	-0,026	-0,067	-0,080	-0,001	-0,031	-0,050	0,002	0,021	0,115	-0,019
L-Äpfelsäure	0,309	0,322	0,447	0,118	0,049	0,250	0,291	0,391	0,382	0,238	0,345	0,450	0,525	0,364
L-Methionin	-0,057	-0,087	-0,095	-0,112	-0,042	-0,090	-0,120	-0,019	-0,062	-0,091	-0,037	-0,044	0,043	-0,122
L-Ornithin	-0,030	-0,058	-0,051	-0,059	-0,005	-0,057	-0,077	-0,003	-0,031	-0,057	-0,055	-0,064	0,112	-0,043
L-Phenylalanin	-0,012	-0,024	-0,068	-0,079	-0,013	-0,063	-0,107	0,037	-0,026	-0,060	-0,072	-0,058	0,050	-0,057
L-Prolin	0,605	0,499	0,730	0,342	0,257	0,648	0,557	0,405	0,560	0,567	0,522	0,682	0,616	0,763
L-Rhamnose	0,655	0,619	0,556	0,634	0,642	0,689	0,642	0,601	0,627	0,644	0,645	0,631	0,788	0,649
L-Serin	0,601	0,629	0,637	0,557	0,469	0,679	0,661	0,368	0,525	0,556	0,680	0,658	0,048	0,679
L-Threonin	0,156	0,292	0,325	0,170	0,195	0,374	0,350	0,154	0,213	0,337	0,356	0,384	0,085	0,376
L-Valin	0,016	0,023	0,065	0,040	0,028	0,137	0,121	0,002	-0,004	0,088	0,089	0,069	0,068	0,031
Maltitol	0,455	0,300	0,537	0,335	0,386	0,543	0,499	0,340	0,367	0,384	0,492	0,474	0,147	0,595
Maltose	0,734	0,729	0,698	0,747	0,776	0,750	0,723	0,686	0,670	0,687	0,767	0,683	0,742	0,690
Maltotriose	0,733	0,736	0,700	0,776	0,776	0,753	0,692	0,711	0,702	0,707	0,801	0,746	0,761	0,756
Methylpyruvate	0,379	0,328	0,337	0,334	0,372	0,393	0,331	0,293	0,320	0,333	0,368	0,427	0,251	0,529
m-Inositol	0,359	0,441	0,472	0,450	0,529	0,583	0,498	0,426	0,441	0,458	0,545	0,511	0,630	0,479
Monomethylsuccinat	0,106	0,063	0,086	0,017	0,109	0,165	0,188	0,026	0,117	0,177	0,172	0,233	0,281	0,254
Schleimsäure	-0,011	0,006	-0,036	-0,081	0,003	-0,023	-0,065	0,028	0,007	-0,003	-0,055	-0,004	0,042	0,012
N-Acetyl-B-D-Mannosamin	0,786	0,743	0,653	0,780	0,724	0,767	0,812	0,723	0,745	0,746	0,791	0,756	0,737	0,754
Oxalsäure	0,138	0,164	0,166	0,090	0,109	0,230	0,195	0,104	0,141	0,194	0,182	0,197	0,051	0,291
Palatinose = Isomaltulose	0,775	0,800	0,741	0,790	0,871	0,829	0,780	0,819	0,763	0,781	0,829	0,778	0,763	0,764
Pektin 2% (1:8 EtOH)	0,261	0,461	0,382	0,173	0,227	0,503	0,434	0,258	0,334	0,410	0,357	0,404	0,327	0,535
Pektin 1%	0,272	0,352	0,341	0,168	0,280	0,442	0,341	0,237	0,324	0,361	0,380	0,319	0,223	0,468
Putrescin	0,243	0,525	0,556	0,129	0,158	0,611	0,582	0,125	0,434	0,488	0,582	0,642	0,219	0,587
Pyruvat	0,386	0,465	0,426	0,351	0,361	0,420	0,401	0,268	0,392	0,376	0,342	0,451	0,216	0,646
Salicin	0,666	0,713	0,611	0,743	0,731	0,707	0,709	0,674	0,668	0,662	0,759	0,652	0,734	0,657
Succinic Acid = Bernsteinsäure	0,522	0,492												

Tab. 20: Extinktionswerte der colorimetrischen Bestimmung der Kohlenstoffverwertung bei *C. sakazakii* ES5 Pigmentmutanten nach 24 h. Die Mittelwerte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	1 4	2 1	24 2	3 1	31 1	38 1	39 1	67 1	68 1	69 1	76 1	79 1	82 2	89 1
2-Desoxy Adenosin	0,545	0,512	0,591	0,547	0,343	0,576	0,531	0,648	0,392	0,293	0,565	0,710	0,559	0,539
Acetic Acid (Essigsäure 96%)	-0,052	-0,022	0,010	-0,027	0,015	0,033	0,038	0,018	-0,037	0,012	0,052	0,049	0,121	0,043
Adenosin	0,647	0,675	0,678	0,651	0,639	0,643	0,595	0,666	0,838	0,603	0,594	0,618	0,596	0,573
α-D-Glucose	0,700	0,762	0,735	0,758	0,828	0,703	0,697	0,785	0,695	0,820	0,708	0,622	0,724	0,674
α-D-Lactose	-0,063	0,018	-0,030	0,022	0,168	0,044	0,060	0,613	0,021	0,081	-0,041	0,068	0,229	0,104
Adonitol	-0,081	-0,029	-0,056	-0,061	-0,023	-0,009	-0,087	-0,055	-0,035	-0,024	-0,116	-0,027	-0,082	-0,045
α-Methyl-D-Glucosid	0,027	0,675	0,332	0,611	0,561	0,689	0,406	0,636	0,440	0,466	0,564	0,543	0,586	0,403
Amygdalin	-0,044	0,018	-0,037	-0,049	0,027	0,036	-0,047	0,043	-0,008	0,012	-0,035	0,119	-0,025	0,043
Arbutin	0,548	0,707	0,671	0,593	0,689	0,651	0,605	0,629	0,710	0,677	0,561	0,714	0,581	0,543
Zitronensäure	0,454	0,574	0,432	0,509	0,402	0,324	0,515	0,571	0,482	0,428	0,543	0,435	0,591	0,251
Kreatin	-0,086	-0,030	-0,063	-0,086	-0,035	-0,089	-0,102	-0,062	-0,043	-0,016	-0,121	0,048	-0,105	-0,084
D-Alanin	0,101	0,290	0,103	0,179	0,335	0,081	0,120	0,208	0,190	0,287	0,244	0,177	0,252	0,064
D-Galactose	0,698	0,746	0,730	0,642	0,805	0,693	0,591	0,700	0,650	0,756	0,608	0,774	0,584	0,607
D,L-Äpfelsäure	0,163	0,271	0,203	0,276	0,157	0,198	0,243	0,204	0,126	0,132	0,154	0,233	0,254	0,268
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,787	0,778	0,782	0,802	0,833	0,772	0,717	0,811	0,819	0,823	0,735	0,657	0,755	0,721
D-Arabinose	-0,033	-0,032	-0,002	-0,037	0,039	-0,006	-0,029	-0,022	0,042	0,029	-0,060	0,039	-0,052	0,002
D-Cellobiose	0,721	0,769	0,779	0,700	0,902	0,754	0,699	0,767	0,851	0,851	0,663	0,718	0,680	0,690
D-Fructose	0,713	0,764	0,756	0,715	0,721	0,753	0,691	0,827	0,662	0,718	0,707	0,627	0,747	0,676
D-Galacturonsäure	0,290	0,693	0,680	0,614	0,752	0,705	0,610	0,644	0,685	0,705	0,605	0,628	0,625	0,528
D-Glucosamin	0,670	0,742	0,691	0,659	0,630	0,689	0,591	0,760	0,655	0,638	0,603	0,710	0,679	0,621
D-Glucose-6-Phosphat	-0,039	0,054	-0,025	-0,086	0,006	0,032	-0,066	-0,028	-0,020	-0,001	-0,091	0,032	-0,094	-0,038
D-Glucuronsäure	0,621	0,656	0,608	0,550	0,776	0,585	0,608	0,610	0,688	0,707	0,659	0,440	0,634	0,506
Dulcitol	-0,083	-0,035	-0,065	-0,111	-0,029	-0,067	-0,105	-0,059	-0,045	-0,012	-0,121	0,059	-0,085	-0,080
D-Äpfelsäure	-0,081	-0,058	-0,067	-0,114	-0,030	-0,084	-0,105	-0,054	-0,046	-0,023	-0,117	0,007	-0,071	-0,078
D-Mannitol = Mannit	0,721	0,768	0,749	0,726	0,760	0,700	0,644	0,751	0,727	0,815	0,686	0,630	0,704	0,656
D-Mannose	0,715	0,736	0,791	0,692	0,781	0,751	0,658	0,718	0,739	0,750	0,668	0,774	0,704	0,649
D-Melibiose	0,776	0,828	0,857	0,746	0,940	0,815	0,711	0,859	0,938	0,893	0,759	0,860	0,786	0,763
D-Raffinose	0,775	0,810	0,861	0,758	0,926	0,766	0,702	0,852	0,928	0,901	0,737	0,872	0,778	0,719
D-Ribose	0,588	0,598	0,357	0,608	0,643	0,589	0,591	0,603	0,655	0,593	0,654	0,678	0,694	0,371
D-Sorbitol	-0,064	0,040	-0,031	-0,065	0,021	-0,054	-0,050	0,024	-0,031	0,015	-0,102	0,032	-0,023	-0,010
D-Trehalose	0,795	0,850	0,794	0,781	0,863	0,789	0,699	0,849	0,853	0,919	0,771	0,813	0,801	0,778
D-Xylose	0,617	0,699	0,643	0,625	0,705	0,648	0,607	0,688	0,705	0,513	0,785	0,574	0,574	0,236
Ameisensäure	0,023	0,135	0,003	-0,057	0,065	0,029	-0,086	0,000	-0,006	0,050	-0,033	0,123	-0,028	0,016
Fumarsäure	0,089	0,477	0,089	0,277	0,486	0,153	-0,011	0,226	0,401	0,426	0,003	0,610	-0,030	0,128
Gentiobiose	0,685	0,728	0,705	0,666	0,643	0,686	0,602	0,714	0,643	0,599	0,671	0,888	0,704	0,638
Glycerol	0,523	0,533	0,508	0,554	0,536	0,527	0,457	0,297	0,481	0,473	0,421	0,573	0,442	0,312
Glyoxylsäure	0,051	0,064	0,056	0,041	0,176	0,065	0,075	0,096	0,005	0,129	0,075	0,139	0,092	-0,031
Inosin	0,685	0,680	0,703	0,644	0,750	0,713	0,619	0,715	0,717	0,689	0,635	0,753	0,684	0,655
Lactose	0,159	0,152	0,165	0,255	0,327	0,238	0,229	0,629	0,392	0,236	0,526	0,138	0,588	0,445
Lactulose	0,068	0,023	0,086	0,074	0,012	0,111	0,126	0,075	-0,005	0,054	0,090	0,058	0,085	0,163
L-Alanin	0,515	0,449	0,529	0,561	0,344	0,532	0,459	0,275	0,320	0,293	0,452	0,244	0,492	0,184
L-Arabinose	0,612	0,661	0,629	0,622	0,703	0,646	0,572	0,717	0,711	0,699	0,619	0,595	0,652	0,637
L-Arabitol	-0,081	-0,035	-0,054	-0,033	-0,023	-0,084	-0,098	-0,054	-0,042	-0,018	-0,122	0,023	-0,095	-0,073
L-Arginin	-0,074	-0,021	-0,058	-0,048	-0,013	-0,081	-0,099	-0,057	-0,033	-0,015	-0,118	0,079	-0,118	-0,065
L-Asparagin	0,003	0,195	-0,004	-0,058	0,180	-0,006	-0,045	0,167	0,128	0,123	-0,055	0,294	-0,028	0,284
L-Asparaginsäure	0,089	0,290	0,014	0,144	0,214	0,001	0,020	0,197	0,126	0,348	0,030	0,507	0,067	0,135
L-Fucose	0,000	0,028	-0,042	0,017	0,013	-0,060	-0,022	-0,008	-0,025	0,010	-0,039	0,033	0,043	0,067
L-Glutaminsäure	0,340	0,298	0,252	0,293	0,088	0,308	0,296	0,402	-0,004	0,068	0,591	0,163	0,500	0,476
L-Glutamin	0,703	0,649	0,828	0,686	0,366	0,794	0,670	0,585	0,235	0,373	0,711	0,464	0,810	0,620
L-Histidin	0,119	-0,001	0,167	0,099	-0,013	0,159	0,100	0,012	0,103	-0,016	0,177	-0,047	0,128	0,057
L-Isoleucin	0,083	-0,003	0,161	0,085	0,009	0,132	0,075	0,030	0,054	-0,007	0,124	0,049	0,144	0,080
L-Milchsäure	0,453	0,488	0,487	0,579	0,262	0,469	0,506	0,566	0,362	0,146	0,546	0,289	0,577	0,530
L-Leucin	-0,015	-0,017	0,004	0,044	-0,024	-0,020	0,031	-0,006	-0,030	-0,016	-0,023	-0,058	0,042	-0,037
L-Lysin	-0,032	-0,026	0,034	-0,015	0,014	-0,025	-0,026	-0,003	-0,022	0,008	-0,063	0,019	0,025	-0,025
L-Äpfelsäure	0,195	0,472	0,302	0,409	0,500	0,357	0,354	0,392	0,371	0,317	0,265	0,653	0,348	0,417
L-Methionin	-0,082	-0,050	-0,064	-0,043	-0,036	-0,093	-0,107	-0,063	-0,044	-0,027	-0,129	-0,003	-0,130	-0,085
L-Ornithin	-0,051	0,074	-0,035	-0,090	0,261	-0,059	-0,077	0,012	0,008	0,021	-0,077	0,060	-0,043	-0,004
L-Phenylalanin	-0,029	0,013	-0,047	-0,032	-0,013	-0,069	-0,055	-0,029	-0,027	-0,005	-0,057	0,059	-0,022	-0,017
L-Prolin	0,643	0,752	0,565	0,701	0,490	0,576	0,664	0,737	0,351	0,375	0,743	0,509	0,772	0,608
L-Rhamnose	0,649	0,667	0,638	0,605	0,705	0,627	0,538	0,704	0,613	0,681	0,605	0,727	0,603	0,651
L-Serin	0,639	0,601	0,677	0,730	0,345	0,661	0,608	0,502	0,374	0,223	0,683	0,297	0,680	0,499
L-Threonin	0,307	0,110	0,375	0,246	0,002	0,396	0,280	0,100	0,171	0,004	0,471	-0,021	0,350	0,205
L-Valin	0,045	-0,058	0,146	0,029	-0,014	0,114	0,084	-0,032	0,250	-0,019	0,109	0,030	0,102	0,026
Maltitol	0,481	0,471	0,578	0,579	0,394	0,531	0,310	0,625	0,212	0,325	0,616	0,235	0,601	0,408
Maltose	0,714	0,732	0,759	0,661	0,803	0,730	0,658	0,723	0,807	0,801	0,633	0,771	0,638	0,684
Maltotriose	0,705	0,723	0,778	0,682	0,803	0,714	0,651	0,794	0,839	0,816	0,683	0,840	0,666	0,743
Methylpyruvate	0,428	0,509	0,402	0,454	0,126	0,414	0,409	0,557	0,325	0,165	0,528	0,291	0,602	0,500
m-Inositol	0,585	0,521	0,519	0,433	0,465	0,531	0,522	0,171	0,474	0,422	0,418	0,524	0,472	0,436
Monomethylsuccinat	0,189	0,272	0,231	0,181	0,201	0,194	0,148	0,209	0,157	0,046	0,105	0,306	0,144	0,147
Schleimsäure	0,009	0,046	-0,017	-0,014	0,006	-0,021	0,010	0,005	-0,016	0,003	0,033	0,044	0,017	0,047
N-Acetyl-β-D-Mannosamin	0,767	0,831	0,813	0,757	0,861	0,763	0,721	0,812	0,773	0,826	0,714	0,771	0,717	0,724
Oxalsäure	0,212	0,138	0,168	0,096	-0,003	0,200	0,170	0,106	0,084	-0,005	0,247	0,060	0,244	0,180
Palatinose = Isomaltulose	0,768	0,798	0,822	0,791	0,877	0,806	0,681	0,855	0,827	0,887	0,709	0,809	0,752	0,736
Pektin 2% (1:8 EtOH)	0,409	0,358	0,394	0,391	0,315	0,425	0,424	0,351	0,385	0,174	0,487	0,170	0,400	0,351
Pektin 1%	0,332	0,323	0,377	0,393	0,141	0,434	0,356	0,343	0,256	0,119	0,361	0,125	0,305	0,393
Putrescin	0,546	0,415	0,576	0,553	0,342	0,593	0,553	0,424	0,308	0,062	0,659	0,218	0,630	0,132
Pyruvat	0,424	0,480	0,437	0,506	0,103	0,438	0,457	0,550	0,296	0,150	0,608	0,248	0,632	0,465
Salicin	0,724	0,436	0,731	0,657	0,745	0,717	0,608	0,685	0,698	0,639	0,608	0,702	0,639	0,619
Succinic Acid = Bernsteinsäure														

Tab. 21: Extinktionswerte der colorimetrischen Bestimmung der Kohlenstoffverwertung bei *C. sakazakii*- und *C. turicensis*-Stämmen sowie des *S. Typhimurium*-Stamms nach 24 h. Die Mittelwerte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	Csa ES5	Csa BAA-894	Csa NCTC 8155	Csa ATCC 29544	Csa CDC 0996-77	Ctu 3032	Ctu E309	ST 4/74
2-Desoxy Adenosin	0,530	0,615	0,474	0,409	0,100	0,440	0,801	0,452
Acetic Acid (Essigsäure 96%)	0,010	0,295	0,307	0,199	0,026	0,039	0,015	0,273
Adenosin	0,580	0,662	0,506	0,444	0,484	0,493	0,843	0,743
α-D-Glucose	0,669	0,820	0,655	0,575	0,490	0,680	0,899	0,830
α-D-Lactose	-0,074	0,013	0,740	0,628	0,532	-0,057	0,075	-0,019
Adonitol	-0,108	-0,026	-0,018	-0,014	-0,004	-0,061	0,015	0,055
α-Methyl-D-Glucosid	0,011	0,736	0,504	0,053	0,217	-0,069	0,350	-0,028
Amygdalin	-0,084	-0,021	-0,071	-0,097	0,000	-0,059	0,028	-0,020
Arbutin	0,573	0,608	0,475	0,496	0,544	0,482	0,798	-0,008
Zitronensäure	0,454	0,402	0,537	0,465	0,262	0,393	0,162	0,733
Kreatin	-0,109	-0,030	-0,185	-0,122	0,042	-0,062	-0,037	-0,027
D-Alanin	0,000	0,277	0,270	0,112	0,108	-0,042	0,409	0,336
D-Galactose	0,632	0,715	0,494	0,484	0,449	0,606	0,899	0,906
D,L-Äpfelsäure	0,222	0,441	0,285	0,233	0,205	0,070	0,172	0,422
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,739	0,862	0,671	0,580	0,563	0,674	0,958	0,898
D-Arabinose	-0,030	0,146	0,180	0,043	-0,002	-0,054	0,036	0,049
D-Cellobiose	0,707	0,854	0,598	0,605	0,627	0,752	0,946	-0,018
D-Fructose	0,649	0,831	0,624	0,564	0,440	0,623	0,935	0,844
D-Galacturonsäure	0,514	0,763	0,576	0,448	0,403	0,558	0,813	0,069
D-Glucosamin	0,620	0,760	0,545	0,533	0,334	0,636	1,022	0,792
D-Glucose-6-Phosphat	-0,109	-0,016	-0,160	-0,107	0,015	-0,046	0,050	0,808
D-Glucuronsäure	0,330	0,642	0,573	0,508	0,313	0,457	0,428	0,799
Dulcitol	-0,111	-0,033	-0,190	-0,129	0,001	0,175	0,760	0,510
D-Äpfelsäure	-0,105	0,005	-0,155	-0,125	0,048	-0,066	-0,072	-0,017
D-Mannitol + Mannit	0,632	0,816	0,585	0,479	0,493	0,599	0,769	0,873
D-Mannose	0,657	0,849	0,618	0,539	0,586	0,672	0,990	0,882
D-Melibiose	0,714	0,923	0,693	0,628	0,623	0,818	0,873	0,914
D-Raffinose	0,708	0,948	0,704	0,659	0,630	0,782	0,900	0,059
D-Ribose	0,585	0,754	0,542	0,461	0,474	0,637	1,383	0,967
D-Sorbitol	-0,089	0,016	0,038	-0,001	0,043	-0,051	-0,027	0,871
D-Trehalose	0,733	0,927	0,753	0,628	0,571	0,880	0,859	1,076
D-Xylose	0,524	0,692	0,464	0,442	0,332	0,479	0,817	0,077
Ameisensäure	-0,101	0,050	-0,037	-0,085	0,003	-0,039	0,081	0,041
Fumarsäure	-0,023	0,394	0,398	0,259	0,221	-0,017	0,304	0,543
Gentiobiose	0,582	0,727	0,562	0,580	0,467	0,377	0,923	-0,022
Glycerol	0,493	0,489	0,402	0,242	0,275	0,462	0,423	0,508
Glyoxylsäure	0,044	0,114	0,006	0,039	0,055	-0,031	0,056	0,039
Inosin	0,596	0,764	0,497	0,502	0,492	0,540	0,854	0,842
Lactose	0,167	0,408	0,678	0,611	0,601	0,113	0,577	0,016
Lactulose	0,069	0,178	0,505	0,543	0,231	-0,002	-0,006	0,031
L-Alanin	0,466	0,544	0,413	0,283	0,173	0,346	0,433	0,429
L-Arabinose	0,529	0,735	0,491	0,483	0,433	0,486	0,770	0,838
L-Arabitol	-0,114	0,015	-0,129	-0,109	-0,005	-0,057	0,022	0,073
L-Arginin	-0,136	0,033	-0,161	-0,115	-0,003	-0,049	0,020	-0,006
L-Asparagin	-0,077	0,045	0,281	-0,083	0,256	-0,034	0,047	0,536
L-Asparaginsäure	-0,104	0,371	0,064	0,006	0,207	-0,005	-0,024	0,509
L-Fucose	-0,026	-0,015	-0,096	-0,067	0,051	-0,043	0,020	0,497
L-Glutaminsäure	0,332	0,698	0,488	0,350	0,051	0,274	0,101	0,403
L-Glutamin	0,697	0,845	0,585	0,581	0,072	0,569	0,814	0,555
L-Histidin	0,169	0,295	0,324	0,184	0,043	0,192	0,065	0,407
L-Isoleucin	0,123	0,159	0,353	0,233	0,002	0,143	0,050	0,061
L-Milchsäure	0,439	0,629	0,475	0,298	0,249	0,321	0,569	0,391
L-Leucin	0,001	0,093	-0,054	0,087	0,053	-0,014	-0,010	0,078
L-Lysin	-0,037	0,090	-0,081	0,030	0,004	-0,046	0,004	0,161
L-Äpfelsäure	0,208	0,487	0,480	0,332	0,225	0,008	0,610	0,618
L-Methionin	-0,144	0,028	-0,178	-0,127	-0,006	-0,055	-0,029	0,074
L-Ornithin	-0,090	0,001	0,086	-0,076	0,005	-0,044	0,052	0,008
L-Phenylalanin	-0,100	-0,025	-0,154	-0,098	0,029	-0,053	-0,008	-0,017
L-Prolin	0,530	0,729	0,614	0,509	0,058	0,325	0,236	0,738
L-Rhamnose	0,579	0,754	0,512	0,304	0,342	0,504	0,775	0,652
L-Serin	0,605	0,709	0,594	0,564	0,196	0,534	0,796	0,574
L-Threonin	0,346	0,523	0,470	0,429	0,057	0,375	0,409	0,490
L-Valin	0,114	0,352	0,379	0,128	0,031	0,142	-0,011	0,328
Maltitol	0,334	0,759	0,469	0,275	0,099	0,210	0,472	0,361
Maltose	0,649	0,822	0,521	0,563	0,598	0,694	0,869	0,896
Maltotriose	0,643	0,846	0,642	0,588	0,579	0,734	0,832	0,967
Methylpyruvate	0,326	0,620	0,433	0,320	0,177	0,253	0,211	0,357
m-Inositol	0,509	0,026	0,456	0,337	0,218	0,557	0,758	0,078
Monomethylsuccinat	0,050	0,350	0,343	0,231	0,146	0,041	0,527	0,446
Schleimsäure	-0,009	0,003	-0,034	0,015	0,011	-0,044	-0,022	0,005
N-Acetyl-β-D-Mannosamin	0,721	0,761	0,688	0,532	0,557	0,638	0,842	0,763
Oxalsäure	0,240	0,221	0,346	0,231	0,005	0,215	0,140	0,245
Palatinose = Isomaltulose	0,693	0,836	0,568	0,593	0,505	0,711	0,863	0,327
Pektin 2% (1:8 EtOH)	0,329	0,583	0,322	0,277	0,117	0,458	0,583	0,198
Pektin 1%	0,343	0,616	0,471	0,314	0,094	0,295	0,388	0,300
Putrescin	0,537	0,463	0,486	0,389	0,036	0,448	0,822	0,341
Pyruvat	0,416	0,627	0,481	0,354	0,198	0,261	0,165	0,465
Salicin	0,612	0,793	0,549	0,523	0,519	0,559	0,773	0,010
Succinic Acid = Bernsteinsäure	0,437	0,458	0,458	0,318	0,256	0,181	0,881	0,705
Sucrose	0,664	0,928	0,673	0,604	0,582	0,759	0,854	0,047
2'-Desoxy-Thymin	0,356	0,310	0,448	0,307	0,014	0,330	0,782	0,577
Turanose	0,253	-0,006	0,139	0,170	0,006	-0,008	-0,026	-0,013
Tween 20	0,078	0,199	0,213	0,064	-0,002	0,102	0,117	0,240
Tween 80	0,409	0,330	0,543	0,424	0,060	0,350	0,596	0,483
Uridin	0,575	0,644	0,495	0,470	0,113	0,495	0,791	0,771
γ-Amino Butyric Acid	0,537	0,701	0,584	0,581	0,056	0,559	0,914	0,259

Tab. 22: Extinktionswerte der colorimetrischen Bestimmung der Kohlenstoffverwertung bei *C. sakazakii* ES5 Biofilm- und Serummutanten nach 48 h. Die Mittelwerte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	BF1	BF2	BF4	BF5	BF8	BF9	BF12	BF13	BF14	BF15	BF16	BF17	51_C4	51_C6
2-Desoxy Adenosin	0,606	0,565	0,551	0,600	0,597	0,602	0,516	0,532	0,484	0,412	0,573	0,509	0,569	0,585
Acetic Acid (Essigsäure 96%)	0,055	0,028	0,059	0,077	0,090	0,054	0,012	0,089	0,031	-0,010	0,010	-0,001	0,006	0,127
Adenosin	0,613	0,658	0,590	0,683	0,701	0,639	0,620	0,641	0,617	0,569	0,669	0,584	0,612	0,585
α-D-Glucose	0,633	0,650	0,630	0,718	0,753	0,726	0,705	0,657	0,683	0,618	0,740	0,657	0,723	0,703
α-D-Lactose	0,357	0,192	0,660	0,186	0,053	0,736	0,360	0,053	0,387	0,457	0,448	0,682	0,673	0,709
Adonitol	-0,049	-0,074	-0,068	-0,046	-0,032	-0,075	-0,102	-0,001	-0,048	-0,073	-0,075	-0,093	-0,026	-0,096
α-Methyl-D-Glucosid	0,642	0,005	0,372	0,701	0,724	0,711	0,402	0,705	0,568	0,368	0,686	0,527	0,751	0,592
Amygdalin	-0,005	-0,056	-0,044	-0,010	0,028	-0,017	-0,130	0,022	-0,043	-0,055	-0,077	-0,080	-0,001	0,018
Arbutin	0,531	0,584	0,556	0,666	0,655	0,569	0,409	0,625	0,347	0,309	0,534	0,520	0,624	0,483
Zitronensäure	0,445	0,313	0,366	0,660	0,532	0,511	0,252	0,640	0,470	0,511	0,396	0,402	0,469	0,494
Kreatin	-0,046	-0,075	-0,080	-0,032	-0,036	-0,080	-0,070	-0,001	-0,054	-0,026	-0,008	-0,108	-0,021	-0,105
D-Alanin	0,071	0,117	0,245	-0,017	0,120	0,075	0,078	0,066	0,091	0,172	0,141	0,062	0,201	0,256
D-Galactose	0,571	0,640	0,572	0,742	0,764	0,680	0,702	0,690	0,638	0,627	0,684	0,609	0,705	0,623
D,L-Äpfelsäure	0,131	0,214	0,276	0,206	0,139	0,190	0,196	0,285	0,262	0,224	0,201	0,211	0,177	0,201
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,743	0,789	0,704	0,803	0,830	0,789	0,816	0,778	0,781	0,791	0,864	0,724	0,757	0,743
D-Arabinose	-0,025	-0,042	0,006	-0,025	-0,016	-0,030	0,030	0,010	-0,023	-0,025	0,033	-0,030	-0,023	-0,025
D-Cellobiose	0,722	0,771	0,771	0,743	0,831	0,739	0,766	0,808	0,739	0,759	0,792	0,707	0,756	0,697
D-Fructose	0,589	0,637	0,635	0,730	0,708	0,703	0,729	0,624	0,661	0,672	0,743	0,659	0,686	0,729
D-Galacturonsäure	0,477	0,537	0,541	0,759	0,653	0,637	0,596	0,719	0,551	0,603	0,617	0,557	0,626	0,633
D-Glucosamin	0,585	0,633	0,546	0,689	0,711	0,698	0,678	0,658	0,572	0,668	0,678	0,586	0,684	0,675
D-Glucose-6-Phosphat	-0,007	-0,051	-0,050	-0,029	0,068	-0,031	-0,130	0,024	-0,044	-0,039	-0,065	-0,073	0,010	-0,070
D-Glucuronsäure	0,592	0,492	0,461	0,743	0,590	0,591	0,493	0,613	0,434	0,539	0,518	0,499	0,409	0,636
Dulcitol	-0,043	-0,074	-0,078	-0,052	-0,036	-0,081	-0,050	0,014	-0,053	-0,074	-0,038	-0,104	-0,028	-0,106
D-Äpfelsäure	-0,056	-0,078	-0,080	-0,051	-0,040	-0,087	-0,059	0,001	-0,058	-0,081	-0,029	-0,111	-0,023	-0,100
D-Mannitol = Mannit	0,615	0,670	0,616	0,716	0,733	0,688	0,694	0,721	0,661	0,669	0,712	0,608	0,725	0,690
D-Mannose	0,719	0,710	0,641	0,778	0,692	0,735	0,745	0,733	0,672	0,693	0,750	0,676	0,760	0,667
D-Melibiose	0,769	0,802	0,825	0,825	0,847	0,786	0,795	0,818	0,803	0,826	0,849	0,772	0,833	0,787
D-Raffinose	0,759	0,786	0,841	0,814	0,865	0,779	0,794	0,883	0,814	0,800	0,881	0,787	0,836	0,790
D-Ribose	0,480	0,520	0,596	0,668	0,614	0,578	0,608	0,736	0,517	0,591	0,616	0,588	0,749	0,649
D-Sorbitol	-0,038	-0,057	-0,024	-0,033	-0,023	-0,073	-0,049	0,042	-0,034	-0,062	-0,017	-0,065	-0,020	-0,055
D-Trehalose	0,762	0,797	0,775	0,797	0,831	0,801	0,782	0,830	0,803	0,795	0,814	0,748	0,828	0,723
D-Xylose	0,567	0,598	0,536	0,652	0,706	0,610	0,613	0,635	0,549	0,564	0,634	0,557	0,673	0,522
Ameisensäure	0,013	-0,056	-0,062	0,059	0,118	0,008	-0,095	0,066	-0,039	-0,057	-0,005	-0,047	0,099	0,050
Fumarsäure	0,292	0,125	0,282	0,072	0,267	0,168	0,011	0,254	0,253	0,178	0,186	0,244	0,282	0,310
Gentiobiose	0,740	0,807	0,752	0,778	0,822	0,779	0,851	0,747	0,808	0,803	0,831	0,755	0,829	0,723
Glycerol	0,339	0,455	0,418	0,617	0,628	0,519	0,469	0,624	0,469	0,467	0,449	0,422	0,473	0,343
Glyoxylsäure	-0,012	0,026	0,037	-0,005	-0,012	0,040	0,013	0,047	0,032	0,040	-0,016	0,042	0,002	0,140
Inosin	0,689	0,690	0,637	0,761	0,748	0,692	0,679	0,687	0,662	0,638	0,748	0,640	0,772	0,626
Lactose	0,327	0,740	0,663	0,269	0,318	0,809	0,461	0,299	0,583	0,722	0,438	0,604	0,757	0,691
Lactulose	0,032	0,362	0,648	0,117	0,427	0,511	0,649	0,071	0,380	0,455	0,726	0,511	0,686	0,506
L-Alanin	0,262	0,443	0,466	0,395	0,266	0,456	0,456	0,421	0,441	0,456	0,457	0,504	0,293	0,312
L-Arabinose	0,511	0,565	0,553	0,677	0,616	0,633	0,649	0,662	0,537	0,587	0,669	0,569	0,696	0,668
L-Arabitol	-0,054	-0,074	-0,079	-0,053	-0,039	-0,080	-0,065	0,000	-0,055	-0,080	-0,040	-0,102	-0,023	-0,107
L-Arginin	-0,045	-0,064	-0,066	-0,045	-0,024	-0,065	-0,048	0,007	-0,045	-0,065	-0,027	-0,091	-0,011	-0,089
L-Asparagin	0,068	0,044	0,074	0,055	0,258	0,132	-0,017	0,279	0,045	0,015	0,115	0,190	0,082	0,148
L-Asparaginsäure	0,129	0,070	0,014	0,153	0,094	0,013	0,068	0,184	0,097	0,054	0,053	0,028	0,203	0,166
L-Fucose	0,031	0,030	-0,014	0,029	0,000	-0,047	-0,040	0,097	-0,010	-0,051	-0,034	-0,025	0,018	-0,051
L-Glutaminsäure	0,246	0,290	0,335	0,242	0,171	0,331	0,304	0,278	0,221	0,287	0,231	0,285	0,260	0,536
L-Glutamin	0,479	0,728	0,771	0,824	0,725	0,763	0,788	0,778	0,671	0,716	0,804	0,694	0,750	0,749
L-Histidin	0,069	0,104	0,142	0,044	0,023	0,143	0,185	0,042	0,088	0,167	0,132	0,137	0,007	0,114
L-Isoleucin	0,030	0,059	0,102	0,072	0,031	0,108	0,072	0,075	0,058	0,128	0,091	0,110	0,016	0,182
L-Milchsäure	0,322	0,387	0,419	0,407	0,333	0,394	0,465	0,338	0,397	0,439	0,407	0,447	0,184	0,557
L-Leucin	-0,014	-0,029	0,020	0,037	-0,013	-0,063	-0,010	0,025	-0,028	-0,036	0,002	0,015	-0,003	-0,016
L-Lysin	-0,021	-0,044	-0,005	-0,029	-0,025	-0,056	-0,028	0,042	-0,027	-0,042	0,000	-0,007	0,008	-0,010
L-Äpfelsäure	0,280	0,303	0,426	0,237	0,248	0,228	0,222	0,414	0,366	0,223	0,353	0,373	0,445	0,342
L-Methionin	-0,052	-0,080	-0,088	-0,062	-0,040	-0,083	-0,122	0,008	-0,058	-0,083	-0,041	-0,108	-0,023	-0,110
L-Ornithin	-0,029	0,039	0,063	-0,032	0,001	-0,008	-0,048	0,022	0,075	-0,009	0,021	0,041	0,032	0,089
L-Phenylalanin	-0,011	-0,023	-0,068	-0,024	-0,017	-0,062	-0,065	0,036	-0,027	-0,059	-0,102	-0,044	-0,009	-0,052
L-Prolin	0,682	0,592	0,698	0,355	0,249	0,664	0,601	0,431	0,575	0,582	0,519	0,652	0,631	0,740
L-Rhamnose	0,664	0,624	0,552	0,630	0,647	0,658	0,645	0,628	0,618	0,641	0,641	0,574	0,681	0,626
L-Serin	0,641	0,636	0,621	0,634	0,548	0,671	0,670	0,534	0,521	0,563	0,661	0,600	0,144	0,611
L-Threonin	0,156	0,298	0,311	0,249	0,212	0,371	0,380	0,194	0,215	0,345	0,355	0,325	0,087	0,416
L-Valin	0,022	0,039	0,077	0,040	0,040	0,150	0,176	0,049	0,010	0,107	0,110	0,095	-0,009	0,035
Maltitol	0,649	0,699	0,661	0,729	0,668	0,707	0,697	0,596	0,555	0,602	0,661	0,656	0,528	0,601
Maltose	0,711	0,750	0,715	0,753	0,792	0,754	0,748	0,704	0,684	0,698	0,684	0,711	0,744	0,664
Maltotriose	0,725	0,759	0,722	0,770	0,784	0,772	0,740	0,727	0,726	0,738	0,801	0,721	0,747	0,755
Methylpyruvate	0,372	0,315	0,320	0,347	0,369	0,386	0,338	0,307	0,313	0,326	0,301	0,361	0,176	0,504
m-Inositol	0,348	0,435	0,456	0,505	0,508	0,552	0,503	0,442	0,425	0,438	0,502	0,461	0,498	0,484
Monomethylsuccinat	0,101	0,058	0,083	0,006	0,108	0,164	0,181	-0,006	0,116	0,175	0,190	0,208	0,149	0,242
Schleimsäure	-0,011	0,005	-0,035	-0,016	-0,002	-0,022	-0,027	-0,025	0,006	-0,002	-0,086	0,008	0,003	0,012
N-Acetyl-β-D-Mannosamin	0,772	0,750	0,666	0,762	0,707	0,779	0,778	0,741	0,748	0,761	0,754	0,716	0,718	0,720
Oxalsäure	0,125	0,148	0,154	0,087	0,102	0,221	0,204	0,106	0,131	0,181	0,154	0,153	0,002	0,259
Palatinose = Isomaltulose	0,766	0,805	0,757	0,812	0,862	0,839	0,761	0,814	0,775	0,802	0,808	0,733	0,796	0,770
Pektin 2% (1:8 EtOH)	0,254	0,448	0,365	0,225	0,217	0,481	0,461	0,255	0,336	0,400	0,320	0,354	0,238	0,508
Pektin 1%	0,259	0,349	0,322	0,218	0,270	0,432	0,364	0,206	0,319	0,359	0,361	0,301	0,174	0,455
Putrescin	0,232	0,547	0,589	0,200	0,162	0,611	0,615	0,162	0,445	0,500	0,568	0,596	0,241	0,627
Pyruvat	0,370	0,460	0,402	0,383	0,353	0,409	0,422	0,310	0,380	0,365	0,234	0,412	0,167	0,584
Salicin	0,679	0,701	0,597	0,713	0,717	0,686	0,678	0,673	0,664	0,659	0,717	0,639	0,737	0,625
Succinic Acid = Bernsteinsäure	0,488	0,												

Tab. 23: Extinktionswerte der colorimetrischen Bestimmung der Kohlenstoffverwertung bei *C. sakazakii* ES5 Pigmentmutanten nach 48 h. Die Mittelwerte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	1 4	2 1	24 2	3 1	31 1	38 1	39 1	67 1	68 1	69 1	76 1	79 1	82 2	89 1
2-Desoxy Adenosin	0,565	0,550	0,597	0,550	0,695	0,579	0,553	0,648	0,552	0,615	0,536	0,643	0,519	0,535
Acetic Acid (Essigsäure 96%)	0,001	0,010	0,038	-0,010	0,166	0,056	0,065	0,107	0,044	0,093	0,046	0,109	0,094	0,068
Adenosin	0,611	0,642	0,654	0,619	0,735	0,658	0,590	0,703	0,799	0,734	0,555	0,631	0,568	0,573
α-D-Glucose	0,672	0,731	0,705	0,707	0,830	0,671	0,654	0,809	0,681	0,808	0,677	0,593	0,683	0,637
α-D-Lactose	0,407	0,174	0,334	0,247	0,681	0,739	0,681	0,774	0,330	0,430	0,556	0,435	0,684	0,666
Adonitol	-0,072	-0,027	-0,052	-0,071	-0,027	-0,058	-0,111	0,005	-0,052	-0,023	-0,107	-0,009	-0,099	-0,034
α-Methyl-D-Glucosid	0,329	0,630	0,715	0,588	0,789	0,728	0,662	0,620	0,670	0,757	0,528	0,766	0,542	0,408
Amygdalin	-0,041	0,018	-0,034	-0,065	0,036	0,061	-0,075	0,086	-0,023	0,025	-0,029	0,104	-0,025	0,045
Arbutin	0,464	0,602	0,567	0,531	0,663	0,559	0,533	0,555	0,562	0,565	0,497	0,681	0,517	0,491
Zitronensäure	0,546	0,519	0,599	0,448	0,388	0,447	0,491	0,508	0,422	0,414	0,480	0,457	0,529	0,226
Kreatin	-0,080	-0,028	-0,058	-0,084	-0,038	-0,078	-0,062	-0,055	-0,060	-0,019	-0,113	-0,007	-0,121	-0,076
D-Alanin	0,106	0,265	0,094	0,163	0,387	0,061	0,143	0,188	0,260	0,325	0,220	0,410	0,233	0,060
D-Galactose	0,671	0,720	0,699	0,638	0,747	0,650	0,610	0,672	0,625	0,708	0,584	0,727	0,553	0,606
D,L-Äpfelsäure	0,173	0,260	0,205	0,244	0,153	0,191	0,221	0,189	0,123	0,141	0,152	0,213	0,258	0,270
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,798	0,770	0,772	0,731	0,810	0,757	0,707	0,791	0,801	0,818	0,712	0,672	0,709	0,701
D-Arabinose	-0,025	-0,027	-0,003	-0,027	0,032	-0,024	-0,036	0,040	0,008	0,028	-0,052	-0,010	-0,034	0,003
D-Cellobiose	0,737	0,768	0,772	0,738	0,850	0,796	0,709	0,770	0,804	0,819	0,646	0,727	0,634	0,674
D-Fructose	0,703	0,731	0,732	0,714	0,716	0,707	0,697	0,702	0,702	0,742	0,663	0,620	0,644	0,636
D-Galacturonsäure	0,275	0,651	0,654	0,591	0,683	0,647	0,562	0,642	0,607	0,637	0,559	0,655	0,547	0,491
D-Glucosamin	0,653	0,708	0,667	0,649	0,634	0,737	0,558	0,739	0,655	0,649	0,549	0,683	0,604	0,560
D-Glucose-6-Phosphat	-0,035	0,052	-0,024	-0,068	0,006	0,006	-0,095	-0,024	-0,042	-0,002	-0,087	0,020	-0,091	-0,036
D-Glucuronsäure	0,584	0,615	0,567	0,517	0,712	0,554	0,551	0,563	0,613	0,651	0,603	0,425	0,557	0,463
Dulcitol	-0,076	-0,030	-0,058	-0,097	-0,032	-0,093	-0,064	-0,051	-0,061	-0,014	-0,112	-0,003	-0,083	-0,070
D-Äpfelsäure	-0,077	-0,050	-0,064	-0,066	-0,032	-0,093	-0,057	-0,040	-0,061	-0,019	-0,110	-0,015	-0,061	-0,070
D-Mannitol = Mannit	0,680	0,748	0,704	0,682	0,759	0,682	0,684	0,696	0,699	0,795	0,641	0,664	0,687	0,617
D-Mannose	0,695	0,721	0,739	0,658	0,795	0,723	0,684	0,702	0,744	0,764	0,617	0,745	0,670	0,619
D-Melibiose	0,796	0,842	0,835	0,720	0,915	0,815	0,730	0,856	0,913	0,867	0,744	0,838	0,791	0,745
D-Raffinose	0,774	0,809	0,822	0,759	0,875	0,765	0,763	0,905	0,886	0,858	0,757	0,833	0,795	0,732
D-Ribose	0,570	0,566	0,344	0,583	0,614	0,569	0,547	0,606	0,613	0,620	0,628	0,701	0,644	0,351
D-Sorbitol	-0,061	0,038	-0,030	-0,026	0,010	-0,057	-0,050	0,047	-0,050	0,011	-0,097	-0,017	-0,009	-0,009
D-Trehalose	0,802	0,843	0,801	0,821	0,865	0,790	0,747	0,827	0,836	0,895	0,746	0,806	0,797	0,770
D-Xylose	0,599	0,667	0,624	0,570	0,675	0,630	0,519	0,595	0,623	0,657	0,485	0,739	0,548	0,229
Ameisensäure	0,030	0,133	0,005	-0,037	0,055	0,021	-0,113	0,003	-0,033	0,042	-0,031	0,108	-0,026	0,019
Fumarsäure	0,256	0,451	0,324	0,410	0,430	0,280	0,347	0,205	0,335	0,381	0,233	0,574	0,158	0,138
Gentiobiose	0,824	0,838	0,850	0,768	0,871	0,798	0,776	0,740	0,824	0,919	0,703	0,809	0,720	0,666
Glycerol	0,514	0,508	0,501	0,537	0,489	0,518	0,497	0,287	0,442	0,436	0,405	0,605	0,435	0,294
Glyoxylsäure	0,055	0,066	0,054	0,043	0,215	0,064	0,118	0,089	0,009	0,177	0,076	0,107	0,172	-0,034
Inosin	0,702	0,705	0,700	0,662	0,767	0,720	0,656	0,691	0,712	0,763	0,599	0,747	0,663	0,663
Lactose	0,630	0,253	0,751	0,332	0,702	0,739	0,536	0,767	0,779	0,423	0,702	0,843	0,791	0,783
Lactulose	0,470	0,419	0,339	0,583	0,056	0,592	0,593	0,361	0,002	0,063	0,687	0,748	0,664	0,244
L-Alanin	0,489	0,425	0,491	0,500	0,429	0,503	0,442	0,248	0,438	0,412	0,451	0,268	0,489	0,171
L-Arabinose	0,600	0,651	0,615	0,642	0,660	0,635	0,609	0,685	0,651	0,664	0,589	0,568	0,635	0,605
L-Arabitol	-0,076	-0,035	-0,055	-0,021	-0,028	-0,070	-0,084	-0,032	-0,057	-0,018	-0,113	-0,006	-0,046	-0,068
L-Arginin	-0,066	-0,016	-0,051	-0,031	-0,007	-0,062	-0,097	-0,047	-0,044	-0,005	-0,105	0,029	-0,064	-0,051
L-Asparagin	0,161	0,210	0,063	-0,003	0,235	0,062	-0,017	0,152	0,189	0,184	0,260	0,322	0,023	0,264
L-Asparaginsäure	0,110	0,283	0,065	0,182	0,272	0,063	0,056	0,173	0,137	0,338	0,071	0,441	0,148	0,147
L-Fucose	0,002	0,028	-0,040	0,001	0,014	-0,065	0,012	-0,007	-0,026	0,015	-0,035	0,028	0,047	0,064
L-Glutaminsäure	0,368	0,320	0,278	0,390	0,152	0,332	0,349	0,520	0,110	0,108	0,620	0,141	0,564	0,476
L-Glutamin	0,760	0,762	0,799	0,757	0,610	0,805	0,761	0,680	0,528	0,516	0,711	0,534	0,816	0,604
L-Histidin	0,127	0,014	0,132	0,083	0,005	0,157	0,125	0,046	0,127	-0,005	0,174	-0,008	0,182	0,069
L-Isoleucin	0,089	0,010	0,103	0,084	0,047	0,129	0,115	0,046	0,099	0,010	0,123	0,021	0,189	0,121
L-Milchsäure	0,440	0,465	0,442	0,603	0,371	0,460	0,534	0,547	0,430	0,228	0,547	0,323	0,549	0,500
L-Leucin	-0,013	-0,015	-0,001	0,076	-0,011	-0,021	0,065	-0,005	-0,035	0,002	-0,019	-0,010	0,036	-0,022
L-Lysin	-0,028	-0,023	-0,012	0,019	0,041	-0,024	0,024	0,012	-0,021	0,025	-0,053	0,015	0,053	-0,008
L-Äpfelsäure	0,192	0,451	0,291	0,402	0,451	0,341	0,377	0,371	0,321	0,305	0,245	0,576	0,381	0,398
L-Methionin	-0,077	-0,045	-0,060	-0,037	-0,036	-0,090	-0,086	-0,037	-0,061	-0,024	-0,120	-0,008	-0,074	-0,077
L-Ornithin	-0,009	0,135	0,012	0,065	0,438	-0,020	-0,012	0,136	0,022	0,048	0,076	0,135	0,091	0,022
L-Phenylalanin	-0,029	0,010	-0,046	-0,053	-0,017	0,014	-0,038	-0,028	-0,039	-0,007	-0,054	0,015	-0,023	-0,016
L-Prolin	0,698	0,793	0,611	0,738	0,624	0,616	0,735	0,712	0,535	0,448	0,695	0,529	0,789	0,562
L-Rhamnose	0,655	0,666	0,633	0,608	0,698	0,633	0,585	0,672	0,688	0,679	0,579	0,701	0,612	0,609
L-Serin	0,645	0,626	0,667	0,730	0,592	0,673	0,659	0,515	0,624	0,342	0,662	0,410	0,676	0,542
L-Threonin	0,316	0,126	0,338	0,260	0,114	0,398	0,320	0,206	0,298	0,056	0,517	0,071	0,455	0,315
L-Valin	0,060	-0,043	0,110	0,057	-0,010	0,125	0,150	-0,003	0,284	-0,005	0,120	-0,003	0,148	0,035
Maltitol	0,725	0,623	0,687	0,702	0,633	0,684	0,530	0,648	0,730	0,611	0,623	0,608	0,650	0,686
Maltose	0,741	0,743	0,771	0,715	0,773	0,746	0,711	0,741	0,795	0,792	0,631	0,736	0,722	0,672
Maltotriose	0,731	0,743	0,809	0,679	0,784	0,739	0,719	0,835	0,809	0,801	0,708	0,807	0,727	0,751
Methylpyruvate	0,427	0,509	0,395	0,480	0,183	0,409	0,429	0,552	0,348	0,217	0,503	0,360	0,593	0,479
m-Inositol	0,566	0,507	0,508	0,447	0,485	0,514	0,554	0,176	0,434	0,442	0,406	0,548	0,511	0,429
Monomethylsuccinat	0,188	0,265	0,224	0,188	0,171	0,187	0,118	0,198	0,118	0,059	0,103	0,245	0,130	0,142
Schleimsäure	0,009	0,043	-0,017	-0,021	0,004	0,071	0,003	0,003	-0,028	-0,001	0,036	0,018	0,042	0,043
N-Acetyl-β-D-Mannosamin	0,770	0,838	0,820	0,748	0,828	0,772	0,769	0,774	0,761	0,811	0,676	0,795	0,739	0,686
Oxalsäure	0,201	0,131	0,156	0,100	0,035	0,185	0,178	0,093	0,107	-0,002	0,229	0,011	0,269	0,169
Palatinoose = Isomaltulose	0,785	0,804	0,833	0,813	0,859	0,821	0,740	0,835	0,812	0,858	0,702	0,838	0,768	0,713
Pektin 2% (1:8 EtOH)	0,394	0,356	0,387	0,386	0,338	0,391	0,440	0,348	0,382	0,199	0,476	0,129	0,428	0,333
Pektin 1%	0,328	0,324	0,359	0,397	0,152	0,426	0,412	0,329	0,282	0,126	0,349	0,082	0,291	0,369
Putrescin	0,565	0,457	0,600	0,595	0,473	0,612	0,635	0,493	0,593	0,225	0,697	0,217	0,646	0,271
Pyruvat	0,413	0,482	0,426	0,501	0,198	0,425	0,507	0,557	0,352	0,223	0,569	0,257	0,641	0,444
Salicin	0,716	0,484	0,718	0,665	0,747	0,721	0,664	0,642	0,677	0,719	0,576	0,646	0,646	0,577
Succinic Acid = Bernsteinsäure														

Tab. 24: Extinktionswerte der colorimetrischen Bestimmung der Kohlenstoffverwertung bei *C. sakazakii*- und *C. turicensis*-Stämmen sowie des *S. Typhimurium*-Stamms nach 48 h. Die Mittelwerte stammen aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

	Csa ESS	Csa BAA-894	Csa NCTC 8155	Csa ATCC 29544	Csa CDC 0996-77	Ctu 3032	Ctu E309	ST 4/74
2-Desoxy Adenosin	0,541	0,565	0,501	0,410	0,374	0,428	0,813	0,426
Acetic Acid (Essigsäure 96%)	0,019	0,277	0,351	0,187	0,015	0,031	0,017	0,249
Adenosin	0,561	0,599	0,558	0,443	0,449	0,472	0,789	0,702
α-D-Glucose	0,669	0,806	0,739	0,559	0,460	0,652	0,832	0,821
α-D-Lactose	0,417	0,919	0,747	0,630	0,518	0,133	0,788	-0,046
Adonitol	-0,096	-0,015	0,018	-0,007	-0,005	-0,059	-0,001	-0,043
α-Methyl-D-Glucosid	0,412	0,756	0,576	0,060	0,408	0,177	0,755	-0,070
Amygdalin	-0,071	-0,011	-0,038	-0,092	-0,001	-0,057	0,001	-0,053
Arbutin	0,488	0,639	0,427	0,427	0,501	0,463	0,673	-0,029
Zitronensäure	0,459	0,357	0,489	0,449	0,286	0,381	0,227	0,654
Kreatin	-0,113	-0,015	-0,169	-0,114	-0,004	-0,059	-0,002	-0,035
D-Alanin	0,029	0,247	0,299	0,102	0,111	0,031	0,582	0,398
D-Galactose	0,628	0,681	0,640	0,484	0,377	0,590	0,873	0,811
D,L-Äpfelsäure	0,249	0,399	0,367	0,247	0,140	0,073	0,291	0,377
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,725	0,812	0,715	0,571	0,495	0,637	0,976	0,822
D-Arabinose	0,022	0,137	0,235	0,043	-0,004	-0,050	0,048	-0,050
D-Cellulose	0,730	0,814	0,690	0,600	0,621	0,721	0,989	-0,052
D-Fructose	0,652	0,825	0,710	0,560	0,431	0,604	0,929	0,696
D-Galacturonsäure	0,523	0,703	0,620	0,439	0,418	0,541	0,800	-0,047
D-Glucosamin	0,616	0,697	0,547	0,519	0,315	0,611	1,005	0,669
D-Glucose-6-Phosphat	-0,082	-0,013	-0,144	-0,102	0,014	-0,049	0,055	0,750
D-Glucuronsäure	0,345	0,606	0,588	0,490	0,249	0,442	0,412	0,775
Dulcitol	-0,108	0,001	-0,172	-0,117	-0,005	0,600	0,852	0,890
D-Äpfelsäure	-0,112	-0,013	-0,109	-0,116	-0,012	-0,059	0,035	-0,041
D-Mannitol = Mannit	0,628	0,784	0,656	0,474	0,426	0,587	0,799	0,810
D-Mannose	0,657	0,826	0,716	0,527	0,532	0,644	0,995	0,791
D-Melibiose	0,721	0,891	0,792	0,621	0,545	0,779	0,948	0,786
D-Raffinose	0,732	0,877	0,744	0,667	0,597	0,841	0,977	-0,032
D-Ribose	0,582	0,738	0,733	0,459	0,423	0,603	1,470	0,790
D-Sorbitol	-0,053	0,009	0,085	0,009	0,002	-0,055	0,078	0,732
D-Trehalose	0,748	0,861	0,771	0,634	0,552	0,818	0,907	0,943
D-Xylose	0,532	0,612	0,514	0,440	0,316	0,461	0,860	-0,050
Ameisensäure	-0,073	0,048	-0,017	-0,077	0,002	-0,042	0,115	0,005
Fumarsäure	0,208	0,357	0,431	0,249	0,149	0,055	0,349	0,515
Gentiobiose	0,757	0,791	0,699	0,723	0,623	0,869	1,065	-0,041
Glycerol	0,487	0,443	0,556	0,245	0,204	0,452	0,434	0,456
Glyoxylsäure	0,069	0,073	0,054	0,048	-0,002	-0,029	0,070	0,002
Inosin	0,629	0,689	0,639	0,501	0,456	0,517	0,920	0,747
Lactose	0,491	0,995	0,798	0,609	0,527	0,134	1,367	-0,019
Lactulose	0,541	0,146	0,736	0,694	0,409	0,014	0,436	-0,046
L-Alanin	0,483	0,474	0,496	0,311	0,222	0,330	0,504	0,418
L-Arabinose	0,542	0,692	0,606	0,479	0,421	0,470	0,841	0,692
L-Arabitol	-0,110	-0,027	-0,103	-0,104	-0,007	-0,057	0,079	-0,066
L-Arginin	-0,092	-0,010	-0,138	-0,104	-0,006	-0,043	0,064	-0,015
L-Asparagin	0,138	0,175	0,389	-0,057	0,232	-0,019	0,075	0,571
L-Asparaginsäure	-0,019	0,322	0,107	0,018	0,173	0,013	0,016	0,447
L-Fucose	-0,022	0,009	-0,073	-0,063	0,001	-0,044	-0,023	0,539
L-Glutaminsäure	0,361	0,643	0,508	0,373	0,054	0,315	0,126	0,327
L-Glutamin	0,704	0,743	0,515	0,560	0,221	0,534	0,829	0,580
L-Histidin	0,187	0,276	0,358	0,180	-0,005	0,187	0,132	0,437
L-Isoleucin	0,138	0,140	0,401	0,230	-0,001	0,143	0,137	0,026
L-Milchsäure	0,450	0,574	0,477	0,308	0,198	0,305	0,679	0,313
L-Leucin	0,012	0,044	-0,019	0,096	-0,004	-0,013	0,083	-0,036
L-Lysin	0,000	0,030	-0,053	0,040	-0,005	-0,046	0,082	0,079
L-Äpfelsäure	0,215	0,461	0,532	0,342	0,208	0,175	0,684	0,497
L-Methionin	-0,108	-0,024	-0,162	-0,118	-0,007	-0,054	-0,032	-0,051
L-Ornithin	-0,044	0,002	0,234	0,221	0,010	-0,041	-0,019	-0,019
L-Phenylalanin	-0,054	-0,025	-0,142	-0,094	-0,004	-0,056	-0,037	-0,051
L-Prolin	0,594	0,685	0,710	0,523	0,387	0,392	0,349	0,667
L-Rhamnose	0,593	0,699	0,590	0,305	0,344	0,478	0,697	0,594
L-Serin	0,629	0,612	0,576	0,549	0,191	0,513	0,845	0,547
L-Threonin	0,370	0,492	0,593	0,433	-0,006	0,374	0,506	0,378
L-Valin	0,140	0,292	0,424	0,130	-0,002	0,141	0,140	0,222
Maltitol	0,675	0,735	0,509	0,686	0,338	0,322	0,901	0,219
Maltose	0,685	0,787	0,578	0,571	0,573	0,665	0,922	0,804
Maltotriose	0,672	0,786	0,658	0,621	0,583	0,718	0,935	0,965
Methylpyruvate	0,317	0,568	0,549	0,371	0,190	0,245	0,316	0,245
m-Inositol	0,512	-0,025	0,501	0,340	0,209	0,520	0,783	-0,052
Monomethylsuccinat	0,056	0,321	0,384	0,238	0,139	0,042	0,433	0,394
Schleimsäure	0,008	-0,004	-0,025	0,015	0,005	-0,045	-0,035	0,897
N-Acetyl-β-D-Mannosamin	0,712	0,727	0,699	0,538	0,536	0,609	0,780	0,821
Oxalsäure	0,218	0,174	0,371	0,227	-0,003	0,210	0,162	0,288
Palatinose = Isomaltulose	0,707	0,794	0,686	0,623	0,556	0,706	0,907	0,352
Pektin 2% (1:8 EtOH)	0,336	0,548	0,348	0,288	0,132	0,447	0,613	0,191
Pektin 1%	0,332	0,594	0,458	0,307	0,090	0,287	0,432	0,256
Putrescin	0,526	0,496	0,696	0,420	0,067	0,497	0,867	0,302
Pyruvat	0,399	0,592	0,611	0,385	0,194	0,251	0,252	0,493
Salicin	0,590	0,720	0,643	0,520	0,517	0,538	0,864	0,041
Succinic Acid = Bernsteinsäure	0,379	0,378	0,509	0,311	0,243	0,176	0,883	0,595
Sucrose	0,699	0,848	0,686	0,607	0,589	0,721	0,858	-0,029
2-Desoxy-Thymidin	0,419	0,499	0,497	0,335	0,051	0,370	0,870	0,521
Turanose	0,646	-0,005	0,338	0,281	0,018	0,047	0,152	-0,042
Tween 20	0,105	0,512	0,316	0,112	0,079	0,097	0,178	0,251
Tween 80	0,709	0,499	0,509	0,776	0,282	0,466	0,547	0,714
Uridin	0,629	0,623	0,540	0,496	0,293	0,520	0,885	0,821
γ-Amino Butyric Acid	0,535	0,582	0,575	0,529	0,339	0,517	0,814	0,334

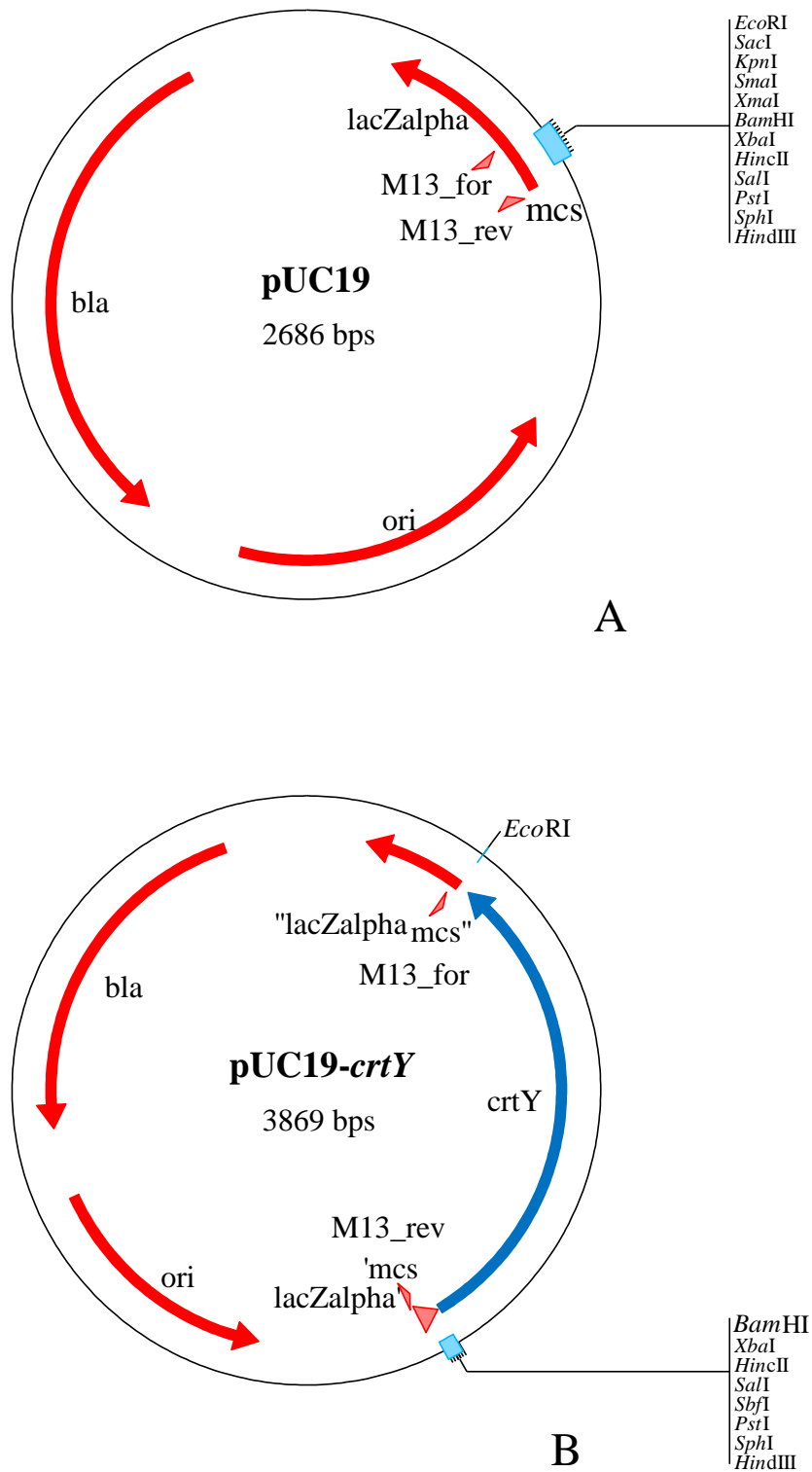


Abb. 47: Plasmidkarten von pUC19-Vektor (A) und pUC19-*crtY* (B). Es sind nur ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die Bereitstellung des interessanten Themas, das Vertrauen und die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Kristina Schauer, meiner Betreuerin. Durch ihre engagierte Anleitung und Unterstützung konnte ich diese Arbeit erfolgreich durchführen und mir innerhalb der letzten zwei Jahre ein umfangreiches Wissen aneignen. Liebe Kristina, vielen Dank für deine zahlreichen guten Ideen, die Ermutigung und Unterstützung bei allen Problemen und Fragen, das Vertrauen in meine Fähigkeiten und vor allem für Deinen Witz und Deine Intelligenz, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass ich so gerne im Labor gearbeitet habe.

Für die gemeinsame Zeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bedanken. Das angenehme Betriebsklima, die netten Pausen, die guten Kuchen und die schönen Weihnachtsfeiern, Wiesnbesuche, Ausflüge und Aktionen werden mir in Erinnerung bleiben.

Ganz besonders danke ich dabei Franziska, Sophia und Eva für die schönen Stunden außerhalb des Instituts – am See, in den Bergen oder bei ausgelassenen Abendevents. Es war eine gute Zeit.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung in den letzten Jahren und dafür, dass ihr mir immer Halt gebt, dass ihr immer da seid. Egal was passiert.

Danke an meine Münchner Mädels, an Andi, an Rosi und Franzi sowie die Leut von daheim. Danke für die manchmal dringend benötigte Ablenkung und die entspannten Stunden, schönen Bergtouren, wilde Feierei und wunderbaren Blödsinn.